

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA



**Síntese e avaliação de derivados bis-alquilamina
de quindolonas como protótipos de novos
antimaláricos bifuncionais**

Marisa Frias Nogueira

MESTRADO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

2010-2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

Síntese e avaliação de derivados bis-alquilamina de quindolonas como protótipos de novos antimaláricos bifuncionais

Orientador: Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo, Faculdade de Farmácia,
Universidade de Lisboa

Co-orientador: Doutora Dinora Maria da Silva Lopes Ferreira, Instituto de Higiene e
Medicina Tropical,
Universidade Nova de Lisboa

Marisa Frias Nogueira

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para a
obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa, 2010-2011

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à Doutora Maria Alexandra Paulo, orientadora desta tese de mestrado, pela incansável ajuda e acompanhamento ao longo deste projecto, pelo apoio na procura de soluções e na resolução dos diversos entraves encontrados.

Os meus agradecimentos direccionam-se igualmente para a Doutora Dinora Lopes, co-orientadora deste trabalho, pelo constante apoio e disponibilidade, pelas críticas construtivas e sugestões que enriqueceram esta tese.

Não quero deixar de agradecer ao Doutor João Paulo Lavrado pelo apoio científico e permanente no esclarecimento de dúvidas no desenvolvimento da componente de síntese.

A todos os meus colegas de laboratório deixo a minha gratidão pelo apoio em toda e qualquer dificuldade, em especial aos amigos Ana Neca, Ana Newton, Cátia Vieira, Daniel Gonçalves, Daniel Silva, Daniela Miranda, Fábio Santos, Lina Fernandes, Marta Magalhães, Teresa Almeida, Ricardo Ferreira, Rita Capela e Vanessa Cabral.

Aos técnicos e auxiliares de laboratório, em especial ao Sr. Francisco, quero deixar um reconhecimento pelo profissionalismo na solução das questões que surgiram ao longo desta caminhada.

A toda equipa do IHMT, em especial à Ana Catarina Alves, Bruno Espírito Santo, Marta Machado e Rita Silva, pelo apoio constante e companheirismo, o meu muito obrigado.

Quero ainda dar um agradecimento muito especial aos meus pais, à minha irmã, ao Diogo Lopes e a toda a minha família, pois sem o seu grande apoio nada disto teria sido possível.

A restante dose de gratidão cabe aos meus amigos mais próximos: Ana Pragana, David Marques, Filipa Pita, Margarida Esteves, Nélia Cardoso, Patrícia Elias, Pedro Oliveira, Raquel Assis, colegas de trabalho e restantes amigos pela paciência e compreensão que tiveram comigo, pelos sorrisos e alegrias que me deram quando isso era impensável. É também graças a eles que este dia chegou.

Resumo

A malária é uma doença parasitária provocada por protozoários do género *Plasmodium* e é particularmente conhecida pela sua elevada morbilidade e mortalidade. Associada a esta situação, surge a resistência a todas as classes de antimaláricos, emergindo a necessidade de desenvolver novos fármacos.

Mutações pontuais e a sobre-expressão do gene *Pfmdr1*, o gene que codifica para o transportador MDR no *Plasmodium falciparum*, são razões apontadas para o decréscimo da sensibilidade do parasita a vários antimaláricos, como à mefloquina, à lumefantrina, à halofantrina, à quinina, à artemisinina e, até certo ponto, também à cloroquina.

Foi demonstrado que as 10-*N*-alquilamina acridonas possuem a capacidade de reverter a resistência à cloroquina em clones multi-resistentes de *P. falciparum* Dd2. Por outro lado, compostos estruturalmente semelhantes, como os derivados bis-alquilamina de quindolonas evidenciaram elevada actividade antimalárica em clones resistentes à cloroquina de *P. falciparum* (W2).

Sabendo que o uso de terapêutica combinada é recomendado no combate à malária resistente, pensou-se que a associação de agentes reversores da resistência ou quimiosensibilizadores a antimaláricos seria uma mais-valia neste cenário de resistência aos fármacos antimaláricos.

Desta forma, sintetizaram-se derivados bis-alquilamina de quindolonas como antimaláricos e quimiosensibilizadores (compostos bifuncionais) de fármacos quinolínicos, como a cloroquina e a mefloquina, em clones multi-resistentes de *P. falciparum* Dd2.

Verificou-se que o composto **77** (derivado 3,7-diclorado-*N*₁₀-*O*₁₁-bis-alquilamina de quindolona) possuía a actividade antimalárica mais elevada em clones de *P. falciparum* Dd2 (227 nM), bastante próxima da apresentada para a cloroquina (180 nM). Foi igualmente visível que a introdução de duas cadeias alquilamina no núcleo de quindolona aumentava a actividade antimalárica. Associada à introdução de cloros no núcleo de quindolona, verificou-se um aumento significativo da actividade antimalárica para os derivados *N*₁₀-*O*₁₁-bis-alquilamina de quindolona.

Foi ainda testada a capacidade do composto **77** sensibilizar clones multi-resistentes de *P. falciparum* Dd2, à cloroquina e mefloquina. O composto demonstrou ser quimiosensibilizador do clone multi-resistente a ambos os fármacos, o que o torna bastante promissor como composto bifuncional.

Palavras-Chave

Malária, Resistência, Reversão da Resistência, Quimiosensibilização, Indolo[3,2-*b*]quinolinas, Quindolona, Compostos Bifuncionais

Abstract

Malaria is a parasite disease caused by protozoa of the gender *Plasmodium* and it is particularly known for its high morbidity and mortality. Currently, the resistance to antimalarials is generalized to all the classes of these drugs. Facing this situation, it is necessary to develop new drugs.

Point mutations and overexpression of the *Pfmdr1* gene, the gene that encodes for the MDR transporter in *Plasmodium falciparum*, are the reasons indicated as responsible for the decrease in the parasite's sensitivity to various antimalarials such as the mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, artemisinin and to some extent, also to chloroquine.

It have been shown that 10-*N*-alkylamine acridones have the ability to revert the resistance to the chloroquine in multi-resistant *P. falciparum* Dd2 strains. On the other hand, structurally similar compounds such as bis-alkylamine derivatives of quindolonas demonstrated high antimalarial activity against *P. falciparum* chloroquine-resistant W2 strains.

Knowing that the use of combined therapy is recommended to combat resistant malaria, it was thought that the combination of reverse resistance agents or chemosensitizers to antimalarials would be an asset in this scenario of resistance to antimalarial drugs.

We now purpose to synthesize bis-alkylamine quindolone derivatives as antimalarial drugs and quinoline chemosensitizers (bifunctional compounds), like chloroquine and mefloquine, against the multi-resistant *P. falciparum* Dd2 strains.

It was found that the compound **77** (3,7-dichloro *N*₁₀-*O*₁₁-bis-alkylamine quindolone derivative) had the highest antimalarial activity to *P. falciparum* Dd2 strain (227 nM), very close to that displayed by chloroquine (180 nM). It was also noticeable that the introduction of two alkylamine chains in the core of quindolone increased the antimalarial activity. Associated with the introduction of chlorine at the core of quindolone, there was a significant increase in antimalarial activity for the *N*₁₀-*O*₁₁-bis-alkylamine quindolone derivatives.

It was also tested the ability of the compound **77** to sensitize *P. falciparum* Dd2 strains to chloroquine and mefloquine. The compound proved to be chemosensitizer of the resistant strain to both drugs, which makes it very promising as a bifunctional compound.

Keywords

Malaria, Resistance, Resistance Reversal, Chemosensitization, Indolo[3,2-*b*]quinolines, Quindolone, Bifunctional Compounds

Índice Geral

Agradecimentos	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice Geral.....	XI
Índice de Anexos	XV
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas.....	XIX
Índice de Esquemas	XXI
Lista de Siglas e Convenções.....	XXIII
Introdução Geral	1
Capítulo 1 - Malária e Agentes Quimioterápicos.....	7
1.1. A Malária.....	9
1.1.1. Ciclo de Vida do Género <i>Plasmodium</i>	10
1.2. Mecanismos de Acção dos Fármacos Antimaláricos.....	12
1.2.1. Alvos Terapêuticos.....	12
1.2.1.1. Hemozoína	12
1.2.1.2. Via de Biossíntese do Folato	13
1.2.1.3. Outros Alvos	13
1.2.2. 4-Aminoquinolinas.....	14
1.2.3. Arilamino-álcoois	15
1.2.4. 8-Aminoquinolinas.....	16
1.2.5. Antifolatos.....	17
1.2.6. Artemisinina e Derivados	18
1.2.7. Outros Compostos Antimaláricos.....	19
1.3. Resistência a Fármacos Antimaláricos.....	20
1.3.1. Mecanismos de Resistência às 4-Aminoquinolinas e 8-Aminoquinolinas.....	21
1.3.2. Mecanismos de Resistência aos Aril-aminoálcoois.....	22

1.3.3. Mecanismos de Resistência aos Antifolatos	22
1.3.4. Mecanismos de Resistência à Artemisinina	23
1.3.4. Mecanismos de Resistência à Atovaquona.....	24
1.4. Agentes de Reversão da Resistência ou Quimiosensibilizadores	25
Capítulo 2 - Indolo[3,2-<i>b</i>]quinolinas, uma Potencial Nova Classe Química de Antimaláricos	31
2.1. Indoloquinolinas de Origem Natural.....	33
2.2. Actividade Antimalárica de Indolo[3,2- <i>b</i>]quinolinas e seus Derivados.....	35
2.3. Métodos de Síntese de Indoloquinolinas	39
Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados	41
3.1. Síntese de Derivados Bis-alquilamina de Quindolonas	43
3.1.1. Síntese de 5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-onas	43
3.1.2. Alquilação de Quindolonas.....	49
3.2. Aplicação da Técnica de Microondas à Reacção de Ciclização Catalisada por Ácido Polifosfórico na Síntese de Quindolonas	57
3.3. Actividade Antimalárica e de Quimiosensibilização dos Derivados de Quindolonas	62
3.3.1. Actividade Antimalárica <i>in vitro</i>	62
3.3.2. Actividade Quimiosensibilizadora.....	64
Capítulo 4 - Conclusão	67
4.1. Conclusão	69
Capítulo 5 - Procedimento Experimental	73
5.1. Reagentes.....	75
5.2. Equipamentos	75
5.3. Métodos Utilizados.....	75
5.4. Síntese Geral de Derivados do Núcleo de Quindolona	76
5.4.1. Síntese dos Ácidos 2-(2-bromoacetamido) benzóico.....	76
5.4.1.1. Síntese do ácido 2-(2-bromoacetamido) benzóico (65).....	76
5.4.1.2. Síntese do ácido 2-(2-bromoacetamido)-4-clorobenzóico (66).....	77
5.4.2. Síntese dos Ácidos 2-[2-(fenilamino)acetamido] benzóicos.....	77

5.4.2.1. Síntese do ácido 2-(2-(fenilamino)acetamido) benzóico (69)	77
5.4.2.2. Síntese do ácido 4-cloro-2-{2-[(4-clorofenil)amino]acetamido}benzóico (70)	77
5.4.3. Síntese da 5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-onas (Quindolonas)	78
5.4.3.1. Síntese da 5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (1)	78
5.4.3.2. Síntese da 3,7-dicloro-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (2)	78
5.4.4. Reacção de Alquilação da Quindolona	79
5.4.4.1. 2-[(10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11-il)oxi]- <i>N,N</i> -dietiletanamina (72).....	79
5.4.4.2. 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (74)	80
5.4.5. Reacção de Alquilação da 3,7-dicloroquindolona	80
5.4.5.1. 3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (75)	81
5.4.5.2. 2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11-il]oxi]- <i>N,N</i> -dietiletanamina (77)	82
5.5. Ciclização do ácido 2-[2-(Fenilamino)acetamido] benzóico pelo Ácido Polifosfórico através do Método de Microondas.....	83
5.6. Ensaio de Susceptibilidade da Fase Eritrocitária do <i>Plasmodium falciparum</i> aos Compostos Sintetizados	84
5.6.1. Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	84
5.6.2. Preparação das Soluções dos Fármacos de Referência e Compostos Sintetizados	84
5.6.3. Ensaio <i>In Vitro</i> pela Técnica de Microteste para Determinação da actividade antimalárica	85
5.6.4. Ensaio <i>In Vitro</i> pela Técnica de Microteste para Estudo da Quimiosensibilização.....	86
Referências Bibliográficas	87

Índice de Anexos

Anexos	XXVII
Anexo I. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-bromoacetamido) benzóico (65) ..	XXIX
Anexo II. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-bromoacetamido)-4-clorobenzóico (66)	XXX
Anexo III. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-(fenilamino)acetamido) benzóico (69)	XXXI
Anexo IV. RMN de Protão e COSY do Ácido 4-cloro-2-{2-[(4-clorofenil)amino]acetamido}benzóico (70)	XXXII
Anexo V. RMN de Protão e COSY da 5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (1) ...	XXXIII
Anexo VI. RMN de Protão e COSY da 3,7-dicloro-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (2)	XXXIV
Anexo VII. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 2-[(10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11-il)oxi]- <i>N,N</i> -dietiletanamina (72)	XXXV
Anexo VIII. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (74)	XXXVIII
Anexo IX. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11(10 <i>H</i>)-ona (75)	XLI
Anexo X. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC, HMBC e NOESY da 2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11-il]oxi]- <i>N,N</i> -dietiletanamina (77)	XLIV
Anexo XI. RMN de Protão da Quindolona 1A (Impuro e Puro)	XLVIII
Anexo XII. RMN de Protão da Quindolona 1B (Impuro e Puro)	XLIX
Anexo XIII. RMN de Protão da Quindolona 1C (Impuro e Puro)	L
Anexo XIV. RMN de Protão da Quindolona 1D (Impuro e Puro)	LI
Anexo XV. RMN de Protão da Quindolona 1E (Impuro e Puro)	LII
Anexo XVI. RMN de Protão da Quindolona 1F (Impuro e Puro)	LIII
Anexo XVII. RMN de Protão da Quindolona 1G (Impuro e Puro)	LIV
Anexo XVIII. RMN de Protão da Quindolona 1H (Impuro e Puro)	LV
Anexo XIX. RMN de Protão da Quindolona 1I (Impuro e Puro)	LVI

Anexo XX. RMN de Protão da Quindolona 1J (Impuro e Puro)	LVII
Anexo XXI. Gráficos Concentração-Resposta da Cloroquina, Mefloquina e Derivados de Quindolonas para Clones de <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 e Dd2	LVIII

Índice de Figuras

Figura 1. Quindolona (1) e 3,7-dicloro-quindolona (2)	5
Figura 2. Distribuição geográfica da malária	9
Figura 3. Ciclo de vida do parasita da malária desde o vector (mosquito <i>Anopheles</i>) ao hospedeiro (Humano)	10
Figura 4. Características morfológicas do <i>Plasmodium falciparum</i>	11
Figura 5. Alguns agentes antimaláricos do grupo das 4-aminoquinolinas	14
Figura 6. Alguns agentes antimaláricos do grupo dos arilamino-álcoois	15
Figura 7. Alguns fármacos antimaláricos do grupo das 8-aminoquinolinas	16
Figura 8. Grupo de alguns dos antimaláricos antifolatos que inibem a DHFR.....	17
Figura 9. Alguns antimaláricos do grupo dos antifolatos que inibem a DHPS.....	17
Figura 10. pABA	17
Figura 11. Artemisinina, seus derivados e deoxiartemisinina	18
Figura 12. Atovaquona	19
Figura 13. Compostos que revertem a resistência a antimaláricos	27
Figura 14. Compostos sintetizados por Guan <i>et al</i> (2002)	28
Figura 15. Compostos sintetizados por Kelly <i>et al</i> (2007)	29
Figura 16. Compostos sintetizados por Kelly <i>et al</i> (2009).....	29
Figura 17. Quindolina	33
Figura 18. Criptolepina	33
Figura 19. Outros alcalóides existentes na planta <i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	34
Figura 20. Actividade antimalárica da quindolina e seus derivados	35
Figura 21. Actividade antimalárica de derivados da criptolepina	36
Figura 22. Actividade antimalárica de derivados da criptolepina sintetizados por Lavrado <i>et al</i> (2008 e 2010)	37
Figura 23. Actividade antimalárica de derivados da criptolepina sintetizados por Wright <i>et al</i> (2001)	38
Figura 24. Ampliação entre os 7,06 ppm e 7,16 ppm do espectro de ¹ H-RMN do composto 69	46

Figura 25. Espectro de NOESY do composto 75	55
Figura 26. TLC comparativo entre o composto 69 (em primeiro lugar), produtos obtidos na técnica de microondas (pela ordem de A-H) e a quindolona 1J	58
Figura 27. Espectro de ¹ H-RMN do composto 69 e 1E impuro	60
Figura 28. Curvas de concentração-resposta da CQ, MQ, CQ + 77 e MQ + 77	65

Índice de Tabelas

Tabela 1. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN para os compostos 65 , 66 , 69 e 70	46
Tabela 2. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN para os compostos 1 e 2	49
Tabela 3. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para os derivados de quindolonas	53
Tabela 4. Resumo da variação das condições na síntese da quindolona 1	57
Tabela 5. Massas e rendimentos obtidos da quindolona 1A-J	58
Tabela 6. Integração relativa dos sinais característicos do precursor 69 nos espectros de ^1H -RMN das quindolonas 1A-J	61
Tabela 7. Actividade antimalárica <i>in vitro</i> da CQ, MQ e derivados da quindolona em clones de <i>P. falciparum</i> sensíveis (3D7) e resistentes (Dd2)	63
Tabela 8. IC_{50} da CQ, MQ e da combinação com o composto 77 em clones resistentes Dd2	65
Tabela 9. Compostos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i> e respectivas concentrações em nM	85

Índice de Esquemas

Esquema 1. Degradação da hemoglobina em aminoácidos	12
Esquema 2. Biossíntese do ácido tetrahidrofólico e ácido dihidrofólico	13
Esquema 3. Síntese da quindolona por Görlitzer e Weber (1981). 1. a) NaOMe, b) PPA	39
Esquema 4. Síntese da quindolina. 1. DMF/1,4-Dioxano, r.t., Overnight; 2. DMF, 120°C, 48 h; 3. PPA, 2h, 130 °C; 4. POCl ₃ , Refluxo, 2 horas; 5. MeOTf, Na ₂ CO ₃ , r.t., 24 horas, HCl. 6. H ₂ , Pd/C, EtOH. R ₁ = H, F, Cl, OMe e R ² = H, F, Br, Cl, Me, OMe, COOH	40
Esquema 5. Síntese de quindolonas. 1. DMF/1,4-Dioxano (1:1), r.t., Overnight; 2. DMF, 120°C, 48 h; 3. PPA, 2h, 130 °C	43
Esquema 6. Mecanismo proposto para a dupla ciclização dos ácidos 2-(2-(fenilamino)- acetamido)benzóicos (69 , 70) a quindolonas (1 , 2)	47
Esquema 7. Síntese dos derivados de quindolonas. 1. K ₂ CO ₃ , NaI, acetona destilada, refluxo	49
Esquema 8. Mecanismo proposto para a síntese dos derivados mono e bis-alquilados de quindolonas	51

Lista de Siglas e Convenções

AcOEt - Acetato de etilo

Bc1 - Citocromo bc1

CQ - Cloroquina

COSY - Espectroscopia de correlação homonuclear de próton-próton

¹³C-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

d - Dupleto

dd - Duplo dupleto

DHFR - Dihidrofolato redutase

DHOD - Dihidroorotato desidrogenase

DHPPP - Dihidropteridina-hidroximetil-pirofosfato

DHPS - Dihidropteroato sintetase

DMF - Dimetilformamida

DNA - Ácido desoxirribonucléico

eq - Equivalentes

FPIX - Ferriprotoporfirina IX

HMBC - Espectroscopia de correlação heteronuclear a longa distância

HMQC - Espectroscopia de correlação heteronuclear a uma ligação

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Protão

Hz - Hertz

IC₅₀ - *Half minimal inhibitory concentration*

IMR - Índice de Modificação de Resposta

IR - Índice de Resistência

IV - Infra-Vermelho

J - Constante de acoplamento

M - Molaridade

MDR - *Multiple Drug Resistance*

Me - Metilo

MeOH - Metanol

MQ - Mefloquina

m - Multiplete

μM - Micromolar

NADPH - Nicotnamida-adenina-dinucleotido-fosfato, forma reduzida

n.i. - Não identificado

nm - Nanómetro

NOESY - Espectroscopia de efeito *overhouser* nuclear

PABA - Ácido para-aminobenzóico

P. chabaudi - *Plasmodium chabaudi*

P. cynomolgi - *Plasmodium cynomolgi*

p.f. - Ponto de fusão

P. falciparum - *Plasmodium falciparum*

PfATP6 - Bomba de cálcio dependente de ATP do *Plasmodium falciparum*

Pfcr - *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

Pfhrp-2 - Proteína-2 rica em histidina do *Plasmodium falciparum*

Pfmdr1 - *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

Pgh-1 - P-glicoproteína homóloga 1

Ph - Fenilo

P. knowlesi - *Plasmodium knowlesi*

P. malariae - *Plasmodium malariae*

P. ovale - *Plasmodium ovale*

PPA - Ácido polifosfórico

ppm - Parte por milhão

P. vivax - *Plasmodium vivax*

q - Quadripleto

RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

r.t. - *Room temperature*

R² - Coeficiente de regressão

s - Singuleto

SAR - Relações Estrutura-Actividade

SERCA - ATPase de cálcio do retículo endoplasmático

SN₂ - Substituição nucleofílica de segunda ordem

STEM - Sistema de transporte de electrões mitocondrial

t - Tripleto

TCTP - *Translationally controlled tumor protein*

TLC - Cromatografia de camada fina

TMS - Tetrametilsilano

t_{1/2} - Tempo de semi-vida

UV-vis - Espectroscopia ultravioleta visível

VD - Vacúolo digestivo

WHO - *World Health Organization*

λ - Comprimento de onda

δ - Desvio químico

δ_C - Desvio químico da ressonância magnética nuclear de carbono

δ_H - Desvio químico da ressonância magnética nuclear de protão

η - Rendimento

Introdução Geral

Introdução Geral

A malária representa um grave problema de saúde pública e desenvolvimento sócio-económico em diversas regiões do planeta, sobretudo em zonas tropicais e subtropicais.^(1, 2)

Em 2007 estimou-se, a nível mundial, que cerca de 2370 milhões de pessoas habitavam em áreas onde havia risco de transmissão de *Plasmodium falciparum*.⁽³⁾

Enquanto no ano de 2000 o número de casos de malária eram de 233 milhões, em 2005 aumentaram para 244 milhões. Em 2009 registou-se uma ligeira descida, para cerca de 225 milhões de casos. Também em termos de mortalidade, houve uma diminuição de 985 000 mortes em 2000 para 781 000 em 2009, sendo esta redução mais marcante na América e África. Contudo 91% das mortes ocorridas em 2009 foram em África, seguido do Sudeste Asiático (6%) e zona mediterrânica oriental (2%). Dos casos de mortes globais, 85% correspondiam a crianças com idades inferiores a 5 anos.⁽²⁾

A falta de investimentos nesta área particularmente em países mais pobres onde a malária é endémica, a inexistência de uma vacina eficaz e a falta de eficácia dos antimaláricos devido ao aparecimento de resistência por parte do parasita, principalmente do *Plasmodium falciparum*, são factores alarmantes que exigem rapidamente uma solução que reverta esta tendência.^(4, 5)

Durante décadas a cloroquina (CQ) foi o medicamento mais extensamente utilizado no tratamento de casos de malária, mas a resistência a este fármaco alastrou-se em praticamente todas as áreas endémicas de malária. A introdução de derivados de artemisinina em combinação com a CQ (ou outros fármacos) no tratamento da doença foi um dos passos dados na redução da resistência. Contudo, desde o relato dos primeiros casos de resistência à artemisinina no Camboja, é incontornável a procura e síntese de novos fármacos antimaláricos.^(4, 6)

Pensa-se que a selecção de parasitas com polimorfismos específicos, particularmente resultantes de mutações pontuais ou sobreexpressão de genes como o *pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter), *pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1), que codificam para transportadores de membrana ou mutações nos genes *dhfr/dhps* (*dihydrofolate reductase gene/dihydropteroate synthase gene*), está associada à redução da sensibilidade dos fármacos antimaláricos e ao mecanismo de resistência.^(4, 5, 7-9)

Diversos estudos indicam que o gene *pfcr1* está associado à resistência à CQ e que o gene *pfmdr1* modela essa resistência e este último ainda está relacionado com a

diminuição da sensibilidade à mefloquina (MQ), lumefantrina, halofantrina, quinina e artemisinina.^(8, 10, 11) Desta forma o papel do *pfmdr1* parece ser importante no processo de diminuição da sensibilidade a diversos fármacos e um alvo a ter em consideração na reversão da resistência.⁽¹¹⁾

Diversos compostos demonstraram ser quimiosensibilizadores ou reversores da resistência, por modificarem a sensibilidade a fármacos antimaláricos em clones resistentes de *P. falciparum*. O verapamil, bloqueador dos canais de cálcio e a imipramina, antidepressivo, são, por exemplo, fármacos que possuem esta propriedade.⁽¹²⁾

O uso combinado de fármacos antimaláricos e reversores da resistência (ou quimiosensibilizadores) no tratamento da malária tem vindo a ser uma estratégia explorada. Kelly *et al* (2009)⁽¹³⁾ sintetizaram compostos com este carácter bifuncional, nomeadamente um núcleo de acridona (cujo alvo terapêutico era o heme) em combinação com um componente quimiosensibilizador a fármacos antimaláricos quinolínicos em clones *P. falciparum* Dd2 (MDR - *multiple drug resistance*). Um dos compostos apresentou ser bastante activo em clones sensíveis e multiresistentes de *P. falciparum*, com elevada eficácia e segurança *in vivo*.

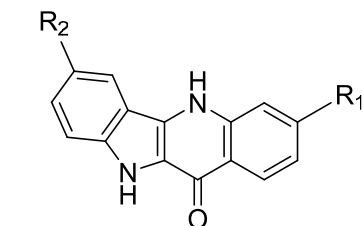
Compostos estruturalmente relacionados com as acridonas, sintetizados por Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾, nomeadamente derivados *N,N*- e *N,O*-bis-alquilamina de quindolonas mostraram ser promissores ao apresentarem um IC₅₀ na ordem dos nanomolar em clones resistentes à CQ de *P. falciparum* (W2).

Desta forma, o objectivo geral deste projecto foi investigar a capacidade destes derivados bis-alquilamina de quindolonas apresentarem actividade antimalárica e quimiosensibilizadora de fármacos quinolínicos, como a CQ e a MQ, em clones de *P. falciparum* Dd2.

Os objectivos específicos deste projecto foram:

- Sintetizar a quindolona (5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona, (**1**), e a 3,7-dicloro-quindolona (3,7-dicloro-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona, (**2**), segundo a técnica de Görlitzer e Weber, adaptada por Bierer (Figura 1);
- Sintetizar derivados *N,N*- e *N,O*-bis-alquilamina de quindolonas;
- Estudar a(s) possível(eis) vantagem(ens) da aplicação da técnica de microondas à reacção de ciclização catalisada por ácido polifosfórico (PPA) na síntese de quindolonas;

- Elucidar a estrutura dos compostos sintetizados por técnicas avançadas de RMN bidimensional, nomeadamente COSY, HMQC e HMBC.
- Testar a actividade antimalárica dos derivados de quindolonas sintetizados, em clones sensíveis à CQ e MQ de *P. falciparum* (3D7) e resistentes a estes fármacos (Dd2) e determinar a actividade quimiosensibilizadora através do Índice de Modificação de Reposta (IMR) do derivado de quindolona mais activo;
- Calcular o Índice de Resistência (IR) dos derivados de quindolonas.



R₁, R₂ = H : Quindolona (1)
 R₁, R₂ = Cl: 3,7-dicloro-quindolona (2)

Figura 1. Quindolona (1) e 3,7-dicloro-quindolona (2).

A tese de mestrado encontra-se dividida em 5 capítulos. De uma forma sumária apresenta-se o conteúdo de cada uma das partes constituintes:

- O **capítulo 1** inicia-se com um pequeno enquadramento da temática da malária, referindo a distribuição geográfica desta doença, o ciclo de vida e a biologia do *P. falciparum*; são descritos igualmente os mecanismos de acção e de resistência dos antimaláricos mais usuais e por fim destaca-se ainda o tema dos agentes reversores ou quimiosensibilizadores da resistência.
- O **capítulo 2** é dedicado às indoloquinolinas e suas acções farmacológicas, focando a actividade antimalárica. É apresentado o mecanismo reaccional utilizado para obter as indolo[3,2-*b*]quinolinas em estudo, nomeadamente a síntese de Görlitzer e Weber, adaptada por Bierer.
- O **capítulo 3** representa a apresentação e discussão dos resultados obtidos na síntese e na determinação da actividade antimalárica dos derivados da quindolona sintetizados, corroborando com os estudos já publicados até à data. É igualmente apresentada a reacção de ciclização catalisada pelo PPA na síntese de quindolonas pela técnica de microondas variando a temperatura e o tempo de reacção. Por fim é apresentado a actividade de quimiosensibilização em clones resistentes de *P. falciparum* Dd2 do composto que possuiu maior actividade antimalárica.

- As conclusões são apresentadas no **capítulo 4** e o procedimento experimental utilizado na síntese dos compostos, sua caracterização espectroscópica, estudos *in vitro* da actividade biológica e de quimiosensibilização no **capítulo 5**.

Capítulo 1

Malária e Agentes Quimioterápicos

1.1. A Malária

A malária é uma infecção parasitária provocada por protozoários do género *Plasmodium* veiculados por um mosquito fêmea do género *Anopheles*.⁽¹⁵⁾ Estima-se que mais de 70 espécies de *Anopheles* possam transmitir o parasita, sendo que o contágio pode ocorrer ocasionalmente através de transfusão sanguínea com sangue infectado ou durante a gravidez (da mãe para o filho).^(5, 15)

Das mais de 150 espécies de *Plasmodium*, apenas 5 são infectantes no Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (esta última é mais característica no sudeste asiático, infectando maioritariamente primatas (macacos), mas também humanos com uma prevalência extremamente baixa).⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ O *P. falciparum* é a espécie com maior distribuição no mundo, sendo igualmente o que causa maior morbilidade e mortalidade.^(5, 15)

Em 2009, a malária era endémica em 109 países, dos quais 43 africanos, 23 americanos, encontrando-se igualmente na área mediterrânea este, sudoeste asiático e pacífico oeste (Figura 2).^(1, 2)

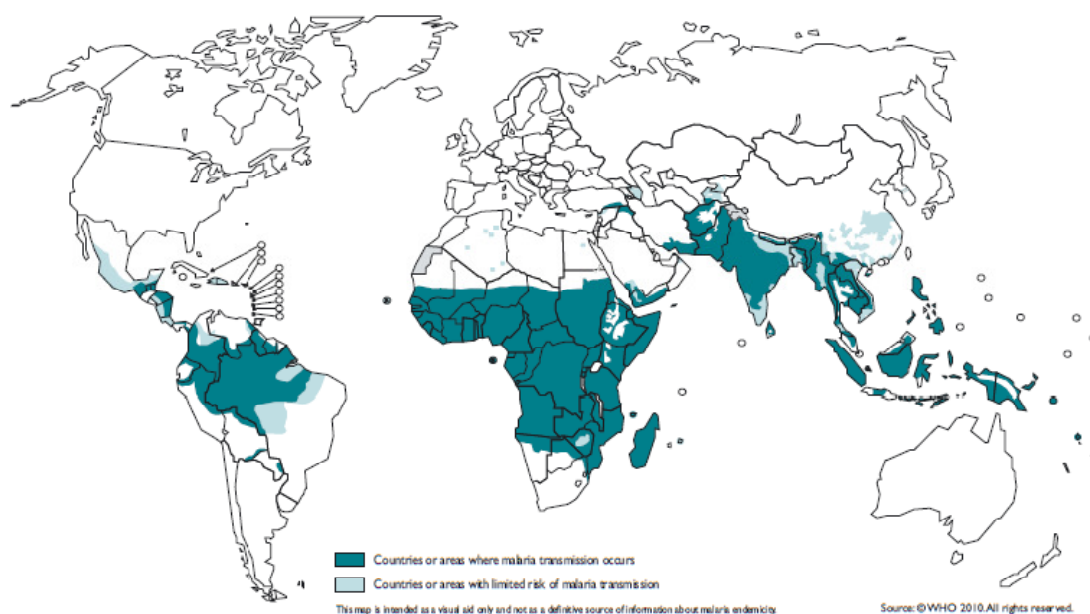


Figura 2. Distribuição geográfica da malária.^(1, 2)

A malária provoca, de uma forma geral, febre, cansaço e mal-estar geral, dores musculares, desconforto abdominal e náuseas.^(15, 18-20) Nas crianças podem ocorrer convulsões, hipoglicémia e anemia; já nos adultos é mais característico a icterícia, edema pulmonar e insuficiência renal aguda.⁽¹⁸⁾ Num estado mais avançado, a

infecção pelo *P. falciparum* pode provocar a disfunção de órgãos vitais, acidose metabólica, anemia mais grave e progredir rapidamente para malária grave ou cerebral (com obstrução dos vasos sanguíneos cerebrais).⁽¹⁸⁾

O processo de erradicação da malária tem sido dificultado pela inexistência de uma vacina eficaz, e principalmente pelo aparecimento e disseminação da resistência aos fármacos antimaláricos e em última instância à falta de investimento na procura e desenvolvimento de novos compostos.⁽⁴⁾

O controlo da malária estabelece-se a dois níveis: na prevenção do contacto entre o homem e o vector (uso de insecticidas e redes mosquiteiras), no uso de medicamentos antimaláricos profiláticos e na área da terapêutica antimalárica.^(4, 15, 18)

1.1.1. Ciclo de Vida do Género *Plasmodium*

O conhecimento do ciclo de vida do *P. falciparum* (Figura 3) foi determinante no desenvolvimento de fármacos antimaláricos e na compreensão do mecanismo de acção dos mesmos.⁽¹⁰⁾

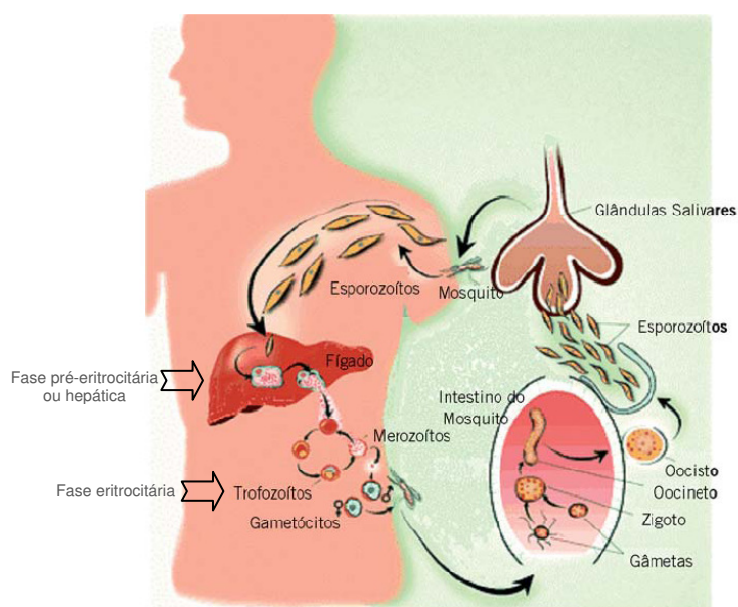


Figura 3. Ciclo de vida do parasita da malária desde o vector (mosquito *Anopheles*) ao hospedeiro (Humano). [Adaptado de (16)]

O ciclo de vida do parasita no vector inicia-se com a ingestão de gametócitos de *P. falciparum* por um mosquito durante a refeição sanguínea de um mosquito fêmea do género *Anopheles*.^(15, 16)

No lúmen do estômago do mosquito, os gametócitos (estádio sexual haplóide) sofrem diferenciação em gâmetas femininos e masculinos, que após fertilização dão origem ao zigoto que, por sua vez, se transforma em oocineto móvel que atravessa o epitélio do estômago do mosquito.⁽¹⁶⁾ Ao fixar-se entre as células epiteliais e a membrana basal inicia-se o desenvolvimento do oocisto o qual por divisão assexuada, origina esporozoítos que são libertados após a lise do oocisto.^(15, 16, 19) Dá-se a migração dos esporozoítos para as glândulas salivares do mosquito e daí estes são injectados no hospedeiro Humano durante uma picada pelo mosquito infectante.^(15, 16, 19)

No Homem, os esporozoítos passam o sistema imunitário e infectam as células hepáticas, onde permanecem e reproduzem-se assexuadamente – fase pré-eritrocitária ou hepática.^(15, 16) Após um período de 5-7dias (para o *P. falciparum*) desenvolvem-se em esquizontes que ao rebentarem libertam milhares de merozoítos para a corrente sanguínea que invadem os eritrócitos - fase eritrocitária.^(15, 16)

Na malária provocada pelo *P. falciparum* ou *malariae*, todos os parasitas infectam as células hepáticas; já noutros tipos de malária (como a causada pelo *P. ovale* e *vivax*) alguns dos esporozoítos diferenciam-se e ficam latentes (hipnozoítos) nos hepatócitos, proporcionando um reservatório do parasita que pode ser activado posteriormente, vários anos após a infecção inicial.^(15, 16)

O desenvolvimento e replicação assexuada dos merozoítos nos eritrócitos, origina parasitas sob a forma de anéis, que se desenvolvem em trofozoítos e seguidamente em esquizontes (Figura 4).^(21, 22) Após o desenvolvimento dos esquizontes ocorre a ruptura do eritrócito e da membrana do parasita libertando os merozoítos (bem como resíduos celulares, que causam febre), começando um novo ciclo de infecção eritrocitária e replicação do parasita.^(15, 16)

Por fim, alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos masculinos e femininos (Figura 4), que poderão ser transmitidos ao mosquito durante a sua refeição sanguínea.^(15, 16)

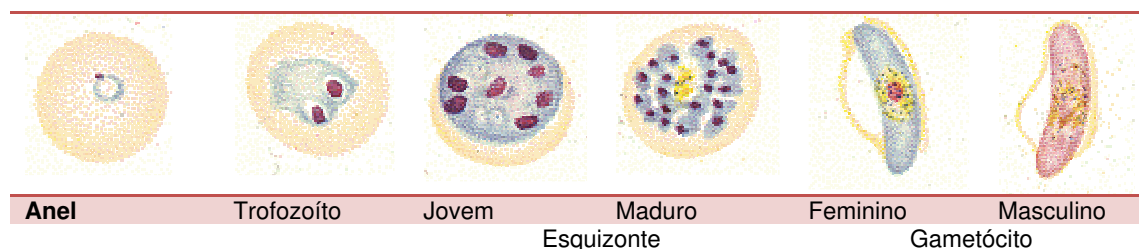


Figura 4. Características morfológicas do *Plasmodium falciparum*. [Adaptado de (21)]

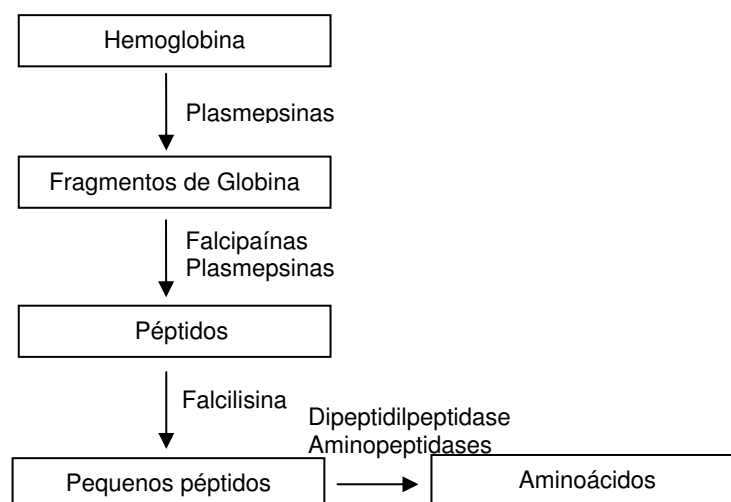
1.2. Mecanismos de Acção dos Fármacos Antimaláricos

O conhecimento da biologia do parasita da malária foi determinante na síntese de novos fármacos, bem como do conhecimento dos mecanismos de acção dos mesmos.⁽¹⁰⁾ Apesar de alguns mecanismos não serem totalmente conhecidos, são utilizados diversos fármacos no controlo da doença, tais como: as 4-aminoquinolinas, arilamino-álcoois, 8-aminoquinolinas, antifolatos, artemisinina (e derivados) e outros compostos como a atovaquona.

1.2.1. Alvos Terapêuticos

1.2.1.1. Hemozoína

O ciclo de vida do *P. falciparum* no hospedeiro é maioritariamente intra-eritrocitário.⁽¹⁵⁾ Nesta fase a hemoglobina é a fonte de aminoácidos essenciais para o parasita e do seu metabolismo resulta a libertação do grupo heme.⁽¹⁵⁾ A digestão da hemoglobina pelo *P. falciparum* inicia-se com a incorporação do citoplasma e hemoglobina através de citostomas, seguindo a sua endocitose e transporte em vesículas de transporte para o vacúolo digestivo (VD).^(14, 16, 18) No VD a hemoglobina é inicialmente hidrolizada por proteases aspárticas, plasmepsinas, e seguidamente por proteases de cisteína, falcipainas, e também por plasmepsinas (Esquema 1).⁽²³⁾ A falcilisina (metaloprotease) degrada os péptidos resultantes, que posteriormente são hidrolisados em aminoácidos pela dipeptidilpeptidase e pelas aminopeptidases (Esquema 1).⁽²³⁾



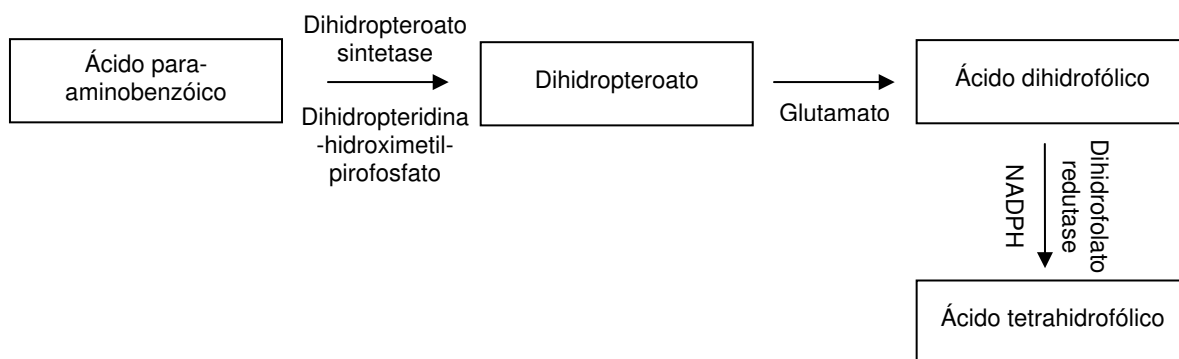
Esquema 1. Degradação da hemoglobina em aminoácidos.

O grupo heme (Fe^{+2} -ferriprotoporpirina IX, FPIX (Fe^{+2})) libertado oxida a hematina (Fe^{+3} -ferriprotoporpirina IX, FPIX (Fe^{+3})), passível de originar stress oxidativo.^(23, 24) A hematina é então destoxificada através da cristalização em hemozoína (cristal insolúvel, inerte e não tóxico).⁽¹⁵⁾

1.2.1.2. Via de Biossíntese do Folato

O género *Plasmodium* necessita de sintetizar cofactores de folato uma vez que não consegue usar os adquiridos de forma externa.⁽¹⁵⁾ Na síntese destes cofactores é necessário um aporte de ácido dihidrofólico e ácido tetrahidrofólico, substratos da via da biossíntese do folato.⁽¹⁵⁾ Este processo envolve várias vias metabólicas catalisadas por diversas enzimas, tais como a dihidropteroato sintetase (DHPS) e a dihidrofolato redutase (DHFR) (Esquema 2).⁽¹⁵⁾

O género *Plasmodium* sintetiza o ácido dihidrofólico através do ácido para-aminobenzóico (pABA). O pABA liga-se à dihidropteridina-hidroximetil-pirofosfato (DHPPP) originando dihidropteroato através da DHPS⁽¹⁵⁾. Posteriormente a conjugação do dihidropteroato com glutamato forma o ácido dihidrofólico⁽¹⁵⁾. Os mamíferos obtêm o dihidrofolato apenas pela redução do ácido fólico ingerido, logo esta diferença entre vias é vital na selectividade de fármacos.^(15, 25) A DHFR é responsável pela redução do ácido dihidrofólico ao ácido tetrahidrofólico, utilizando o NADPH como doador de electrões.⁽¹⁰⁾



Esquema 2. Biossíntese do ácido tetrahidrofólico e ácido dihidrofólico.

1.2.1.3. Outros Alvos

Outra enzima alvo do parasita, a dihidroorotato desidrogenase (DHOD), catalisa a conversão de dihidroorotato a orotato (intermediário na biossíntese da pirimidina).⁽¹⁵⁾

Outros possíveis alvos como o aplicoplasto são igualmente organelos do parasita que poderão ter relevância para futuros alvos terapêuticos.⁽¹⁵⁾

1.2.2. 4-Aminoquinolinas

Os fármacos antimaláricos mais representativos do grupo das 4-aminoquinolinas são a CQ (3) e a amodiaquina (4) (Figura 5).

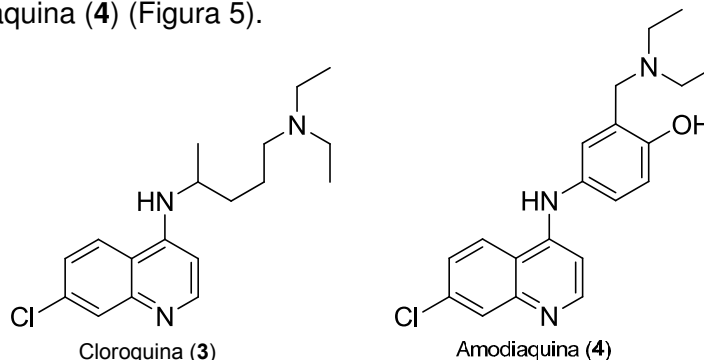


Figura 5. Alguns agentes antimaláricos do grupo das 4-aminoquinolinas.

A CQ (3) foi primeiramente sintetizada tendo como base a estrutura química da quinina.^(15, 25) Devido à sua eficácia, baixo custo e baixa toxicidade tornou-se um fármaco extensivamente utilizado durante várias décadas em praticamente todas as regiões endêmicas de malária.^(19, 25)

A CQ actua na fase eritrocitária do parasita, evitando a cristalização do grupo heme no VD, provocando a acumulação de níveis tóxicos do heme que pode conduzir à morte do parasita.⁽²⁵⁻²⁷⁾ Contudo sabe-se que cerca de 80% do heme difunde para o citosol (sendo a quantidade remanescente de heme no VD não suficiente para conduzir à morte) onde é degradado pela glutatona reduzida.⁽¹⁰⁾ Pensa-se assim que a CQ forme um complexo com o grupo heme, inibindo a sua degradação pela glutatona.^(10, 15) A CQ inibe igualmente a ligação do heme à enzima Pfhrp-2 (proteína-2 rica em histidina do *Plasmodium falciparum*), resultando na não conversão do heme em β -hematina.⁽¹⁵⁾

Também a amodiaquina (4) impede a formação de hemozoína e é mais efectiva que a CQ.^(5, 16) Contudo possui efeitos secundários significativos, nomeadamente agranulocitose e hepatotoxicidade, devido à formação de derivados quinona-imina (consequente da sua oxidação metabólica) que se ligam covalentemente às proteínas.^(5, 16) É de realçar que a distância entre o azoto quinolínico e dialquilamínico da amodiaquina é de 8,30 Å (separada por 4 carbonos), sendo comparável com a distância de 8,38 Å correspondente à CQ.⁽¹⁶⁾

1.2.3. Arilamino-álcoois

A MQ (5), halofantrina (6) e lumefantrina (7) são arilamino-álcoois estruturalmente semelhantes à quinina (8) (Figura 6). Estes compostos são bases monopróticas que após protonação mantêm-se dentro do VD.⁽¹⁶⁾

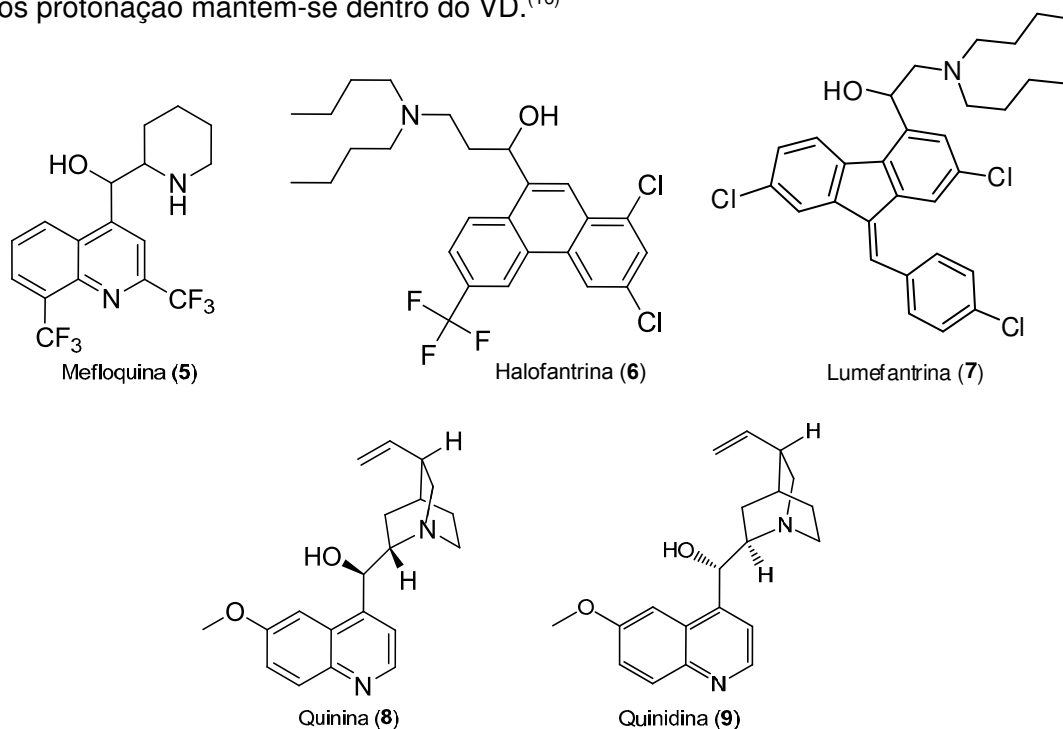


Figura 6. Alguns agentes antimaláricos do grupo dos arilamino-álcoois.

A MQ (5) foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial, face às resistências aos antimaláricos existentes até à data.^(15, 25) A MQ é efectiva na fase intra-eritrocitária do *P. falciparum*, sendo necessária uma dose única em zonas com baixo nível de resistência.^(15, 25) Este fármaco é recomendado como profilático.^(10, 15, 16) A MQ inibe a endocitose de nutrientes para o VD e interfere na formação da hemozoína.^(10, 15) A presença do grupo hidroxilo na MQ permite a formação de ligações de hidrogénio com a amina terciária, sendo esta essencial para a actividade do fármaco.⁽¹⁵⁾

Também o mecanismo de acção da halofantrina (6) e da lumefantrina (7) consiste na interacção com o grupo heme.^(15, 16) A halofantrina actua nos esquizontes e acumula-se 60% mais nas células infectadas. Este fármaco inibe também a proteína cinase dependente da AMP-cíclica de uma bomba de protão existente na membrana de interface entre o parasita e o humano.⁽¹⁵⁾

A quinina (8) foi isolada em 1820 a partir da casca de várias espécies de árvores do género *Cinchona* e actua na fase intra-eritrocitária do *P. falciparum*. Por apresentar elevada toxicidade e efeitos secundários a sua utilização limita-se apenas ao

tratamento de casos graves.^(5, 10, 16) Sabe-se que a quinina inibe a degradação da hemoglobina no VD dos parasitas.^(15, 25) A quinidina (**9**) é um diastereoisómero da quinina e é aproximadamente dois terços mais activa para o *P. falciparum*.^(15, 25)

1.2.4. 8-Aminoquinolinas

Pertencem ao grupo das 8-aminoquinolinas (Figura 7) os fármacos primaquina (**10**), tafenoquina (**11**) e um fármaco mais recente, a elubaquina (**12**).

A primaquina (**10**) é utilizada no tratamento de infecções por malária do *P. vivax* e em casos de profilaxia causal.⁽¹⁵⁾ Actua nas formas exo-eritrocíticas primárias, nos hipnozóitos (*P. vivax* e *P. ovale*) e em doses tóxicas nas formas sanguíneas assexuadas (*P. vivax* e *P. falciparum*).^(15, 16) Este fármaco é tóxico em pacientes com deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária (que causa anemia hemolítica), provocando a formação de metamoglobina a partir da oxihemoglobina, conduzindo à perda da capacidade de transporte do oxigénio para os tecidos.⁽¹⁶⁾

O mecanismo de acção da primaquina, bem como das outras 8-aminoquinolinas, é ainda desconhecido. Pensa-se que provoque a inibição do transporte de electrões na cadeia respiratória do parasita.⁽²⁷⁾

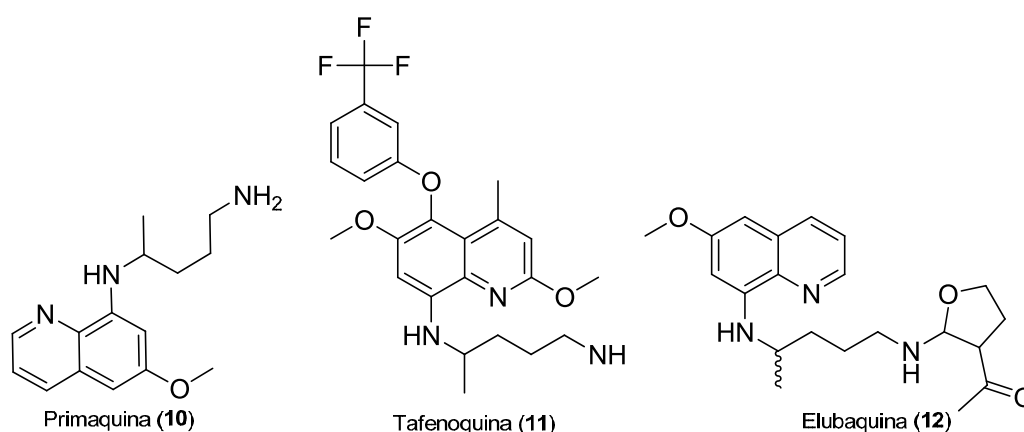


Figura 7. Alguns fármacos antimaláricos do grupo das 8-aminoquinolinas.

A partir da primaquina, após introdução de algumas modificações, surgiu a tafenoquina (**11**) que é eficaz contra as fases hepáticas, eritrocitárias, gametócitos e hipnozóitos. A molécula possui perfis de segurança e actividade superiores à primaquina e é bem tolerada como profilático.⁽¹⁵⁾ A elubaquina (**12**) é a 8-aminoquinolina mais recente e apresentou actividade para a estirpe *P. cynomolgi* em

macacos *rhesus*.⁽¹⁶⁾ A molécula em si apresenta também menos toxicidade, essencialmente a nível do aumento de metemoglobinemia e encontra-se em ensaios clínicos em humanos.^(16, 28)

1.2.5. Antifolatos

Os fármacos do grupo dos antifolatos possuem actividade antimalárica através da inibição da DHFR (Figura 8) ou da DHPS (Figura 9).⁽¹⁶⁾

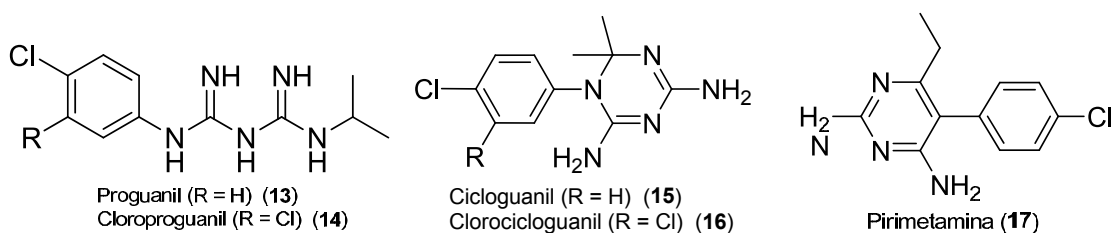


Figura 8. Grupo de alguns dos antimaláricos antifolatos que inibem a DHFR.

O proguanil (13) é um óptimo profilático da malária causada pelo *P. falciparum* (em combinação com a CQ), sendo activo na fase pré-eritrocitária mas não nos hipnozóitos. O cloroproguanil (14) resultou da cloração do grupo fenil do proguanil e tornou-se num bom substituto em locais onde se verificou a resistência ao proguanil. Estes dois fármacos pertencem ao grupo das biguanidas e são profármacos, sendo, respectivamente, o cicloguanil (15) e o clorocicloguanil (16) os metabolitos activos.^(15, 16)

A pirimetamina (17) é uma diaminopirimidina que rapidamente começou a ser usada em combinação com a sulfadoxina devido ao aparecimento de resistência a 17.^(10, 15)

O cicloguanil, o clorocicloguanil e a pirimetamina ligam-se à DHFR do parasita (com maior afinidade que para a enzima humana) competindo com o ácido dihidrofólico.^(15, 16)

Os fármacos mais utilizados na inibição da DHPS são o grupo das sulfonamidas, sulfadoxina (18) e o sulfalene (19), e o grupo das sulfonas, como a dapsona (20) (Figura 9).^(10, 15, 16)

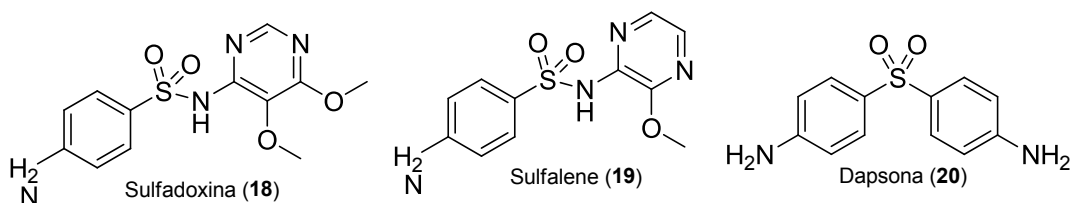


Figura 9. Alguns antimaláricos do grupo dos antifolatos que inibem a DHPS.

A sulfonamidas/sulfonas possuem uma estrutura semelhante ao pABA (**21**) (Figura 10) competindo com o mesmo e formando aductos não metabolizáveis que inibem a DHPS, resultando na diminuição da DHPPP e consequentemente a redução da

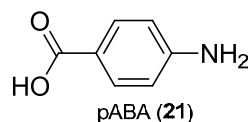


Figura 10. pABA.

síntese de DNA. A competição com o pABA pode justificar a baixa eficácia deste grupo de antimaláricos, usando-se assim a combinação de inibidores da DHPS e DHFR (como a sulfadoxina-pirimetamina, dapsona-cloroproguanil, dapsona-proguanil), que ao inibir o funcionamento de ambas as enzimas, culmina na morte dos parasitas por perturbação da síntese de DNA.^(10, 15, 16, 18) Este efeito sinérgico observado é extremamente útil em casos de profilaxia, no entanto está por vezes associado a reacções de pele como a síndrome de Stevens-Johnson.⁽¹⁵⁾

1.2.6. Artemisinina e Derivados

A artemisinina (**22**) (Figura 11) foi isolada em 1971 da espécie vegetal *Artemisia annua*, a qual era largamente usada na medicina tradicional chinesa como antipirético.^(10, 15, 16) A artemisinina apresenta uma eliminação rápida da parasitemia, elevada eficácia na malária cerebral e está associada a uma baixa toxicidade.^(5, 15) Mas devido à sua alta taxa de recrudescência, baixa biodisponibilidade oral, tempo de semi-vida curto e baixa lipo e hidrossolubilidade, têm-se desenvolvido diversos derivados semi-sintéticos da artemisinina.⁽¹⁰⁾ Destes derivados, os mais utilizados em terapêutica são a di-hidroartemisinina (**23**), arteméter (**24**), arteéter (**25**) e artesunato (**26**) (Figura 11).⁽¹⁰⁾

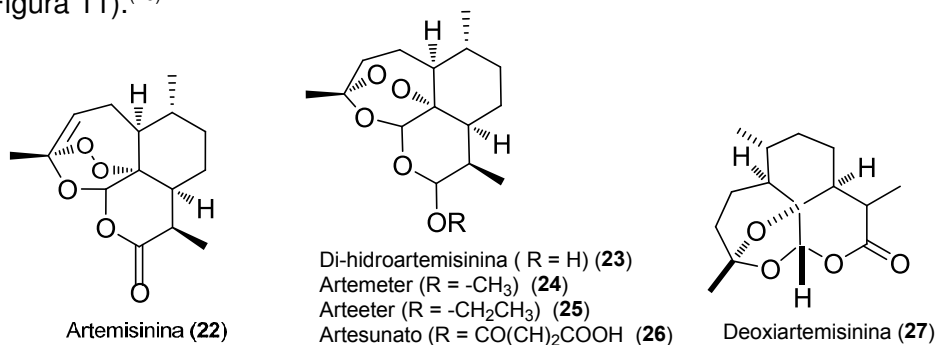


Figura 11. Estruturas químicas da artemisinina, seus derivados e deoxiartemisinina.

A artemisinina e seus derivados são lactonas sesquiterpénicas que possuem uma ligação endoperóxidica que é vital na actividade antimalárica. Quando se substitui esta ligação por apenas um oxigénio (deoxiartemisinina (**27**), Figura 11) verifica-se a perda da actividade.^(10, 19, 25, 29) A artemisinina é activa na fase intra-eritrocitária e nos gametócitos, com uma maior selectividade para os eritrócitos infectados.^(7, 15)

O mecanismo de acção ainda não foi totalmente compreendido, mas pensa-se que se inicie com a quebra da ligação peroxídica devido à transferência de um electrão do Fe^{+2} do grupo heme, formando radicais primários ou secundários centrados no carbono.^(10, 15, 16, 30) Segue-se a geração de stress oxidativo, ocorrendo a alquilação de alguns alvos proteicos (como a catalase, glutatona, glutatona redutase), ou do citocromo c (interferindo com o sistema de transporte de electrões mitocondrial (STEM), inibindo a cadeia respiratória), ou da TCTP (*translationally controlled tumor protein*) ou do grupo heme (impedindo a sua destoxificação em hemozoína).^(10, 15, 29, 30)

Por outro lado, sabe-se que a artesiminina (e derivados) inibe igualmente a bomba de cálcio dependente de ATP localizada no retículo endoplasmático (PfATP6) ao alquilá-la após activação por iões de ferro, afectando o transporte de cálcio no parasita^(10, 19, 25, 29). Este alvo molecular foi identificado por Eckstein e seus colaboradores após verificarem que a artemisinina era estruturalmente semelhante à taspigargina, um inibidor da ATPase de cálcio do retículo endoplasmático (SERCA).⁽¹⁰⁾ Ao identificarem um homólogo do SERCA no *P. falciparum*, a PfATP6, expressaram-na em oócitos de *Xenopus*, verificando que a artemisinina inibia a sua actividade.^(10, 29, 30)

A combinação de artemisinina (ou derivados) com MQ ou lumefantrina (arteméter e lumefantrina, “co-arteméter”), tem tido grande êxito em áreas onde o *P. falciparum* é resistente a múltiplos fármacos. A rápida acção dos derivados da artemisinina elimina uma elevada quantidade de parasitas, enquanto o outro antimalárico com um tempo de semi-vida mais longo, actuando nos remanescentes.^(16, 20, 25)

1.2.7. Outros Compostos Antimaláricos

A atovaquona (**28**) (Figura 12) é uma hidroxi-naftoquinona classificada como inibidor mitocondrial desde 1940 e certificada em 1997 como antimalárico, em combinação com o proguanil (Malarone®, que é recomendado como profilático).⁽²⁵⁾

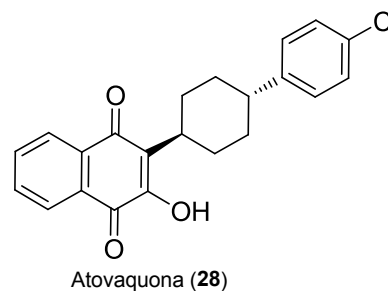


Figura 12. Atovaquona.

A atovaquona inibe moderadamente a DHOD, resultando na acumulação de dihidroorotato e carbamoil-aspartato; inibe também o STEM do parasita, afectando a biossíntese da pirimidina.⁽¹⁶⁾ A atovaquona promove o colapso do potencial de membrana plasmodial, inibindo o citocromo bc1 no complexo III do STEM, seguindo-se a inibição de uma série de enzimas metabólicas ligadas à ubiquinona. A atovaquona é selectiva para a mitocôndria do parasita, visto esta possuir um complexo de coenzima Q_8 enquanto a humana possui um complexo coenzima Q_{10} .^(15, 25)

1.3. Resistência a Fármacos Antimaláricos

A WHO (2001) define a resistência aos antimaláricos como a capacidade que um parasita possui, para sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco e no tempo necessário para a sua acção normal, que normalmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou preveniriam a sua multiplicação.⁽³¹⁾ A nível farmacológico a resistência é definida pelo deslocamento da curva de dose-resposta do fármaco para a direita, sendo necessárias doses mais elevadas para ocorrer a morte dos parasitas ou em última instância o controlo da multiplicação dos parasitas.⁽¹⁸⁾

O primeiro caso de resistência a fármacos antimaláricos surgiu no tratamento com a quinina em 1910; actualmente verifica-se resistência a todas as classes de antimaláricos.^(5, 15, 18) Este fenómeno de resistência pode dever-se à administração inadequada de fármacos (como tratamentos incompletos, sobreuso de antimaláricos na profilaxia, automedicação), condições do hospedeiro como o sistema imunitário/farmacogenética e propriedades intrínsecas do fármaco utilizado.^(15, 25)

A resistência por parte do parasita a determinado antimalárico resulta geralmente de uma mutação ou alteração da replicação genética, o que condiciona o funcionamento dos transportadores de membrana do VD como a P-glicoproteína homóloga 1 (Pgh-1) e *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (PfCRT), ou nas enzimas DHFR/DHPS e bc1.^(8, 18)

Diferentes padrões de mutações no *pfprt* conferem resistência à CQ no *P. falciparum*. A isoforma Dd2 é codificada por um alelo encontrado em clones resistentes de *P. falciparum* isolados no sudeste asiático e africano. O clone Dd2 difere dos clones sensíveis em 8 codões existentes no alelo HB3 (74–76, 220, 271, 326, 356, 371).^(19, 32-36) Jonhson *et al* (2004)⁽³⁶⁾ acrescenta ainda, para além dos já referidos, mais cinco haplótipos, nomeadamente no codão 72, 97, 152, 163 e 275. O gene *pfmdr1* mostrou estar igualmente envolvido, com haplótipos nos codões 86, 184, 1034, 1042 e 1246.⁽³⁷⁾

O clone Dd2 apresenta resistência não só à CQ, como à MQ, sulfadoxina e pirimetamina.^(19, 32-34)

1.3.1. Mecanismos de Resistência às 4-Aminoquinolinas e 8-Aminoquinolinas

Os primeiros focos de resistência do *P. falciparum* à CQ surgiram no final dos anos 50 na Colômbia e na Tailândia, sendo actualmente visível na maioria das regiões endêmicas de malária.^(9, 15, 19, 25)

A resistência do *P. falciparum* à CQ é multigénica.⁽⁷⁾ A mutação e aumento da expressão do gene *pfcr1* e do *pfmdr1* que codificam respectivamente, para as proteínas PfCRT e Pgh-1 (transportadores do tipo ABC), estão envolvidos no processo de resistência.^(7, 9, 15) Pensa-se que outros genes que codifiquem para transportadores que modelam o pH do VD estão associados ao fenómeno de resistência.^(7, 9, 15, 18, 25, 30)

Várias mutações no *pfcr1*, como a M74I, N75E, K76T, A220S, Q271E, N326S, I356T, e R371I distinguem um parasita resistente de um sensível.⁽⁹⁾ Curiosamente a mutação K76T no *pfcr1* foi encontrada consistentemente em todos os parasitas resistentes isolados, sendo por isso o marcador molecular mais utilizado em estudos de monitorização da resistência.^(5, 8, 25, 27, 30, 38, 39) Na mutação K76T, ocorre a substituição de um aminoácido carregado positivamente, que limita o efluxo de CQ, por um neutro (permuta do aminoácido lisina pela treonina na posição 76) conduzindo à saída do fármaco para o citoplasma.^(25, 26, 38) Assim se surgirem mutações em que o poro adquira carga positiva, pode ocorrer compensação do efeito da mutação K76T e reverter a resistência.^(30, 38)

Outra das hipóteses para a diminuição da concentração de CQ no VD é a alteração do gradiente de pH entre o VD e o citoplasma, já que é requerido pH baixo para acumulação da CQ no VD e talvez o aumento de pH esteja relacionado com a sua saída.⁽²⁶⁾ Contudo, Hayward *et al* (2006)⁽⁴⁰⁾ concluiu que não existiam diferenças significativas do pH do VD entre os parasitas sensíveis e resistentes à CQ. Assim Lehane *et al* (2008)⁽⁴¹⁾ conclui que existe um efluxo dependente de energia (de gradiente de protões) em ambas as estripes com diferentes propriedades cinéticas, o que resulta num efluxo menos eficiente pelos parasitas sensíveis. Já para Hyde *et al* (2007)⁽²⁵⁾ o efluxo da CQ nos parasitas resistentes parece ser independente de energia, o que implica o transportador PfCRT apresentar-se sob a forma de poro.

Reed *et al* (2000) demonstrou que mutações na Pgh-1 não conferem resistência, só por si, à CQ, mas poderão provocar o aumento da resistência por diminuírem a acumulação do fármaco^(26, 42).

A resistência à amodiaquina foi observada em proporções menores do que à CQ, verificando-se uma associação entre a resistência de ambos os fármacos, o que poderá demonstrar mecanismos de resistência comuns, quer por o mecanismo de acção de ambos os fármacos ser semelhante quer pela sua estrutura química.^(15, 20, 43, 44) Mutações no *pfmdr1* estão associadas à resistência à amodiaquina, por alteração da expressão da Pgh-1 e consequente exclusão do fármaco do VD. O polimorfismo mais comum é o N68Y, relatado em 6 estudos diferentes. Foram encontrados outros polimorfismos no *pfmdr1* no codão 184 e 1246, apesar de serem mais raros.^(15, 20, 43, 44) Curiosamente um estudo em Madagáscar mostrou um aumento da sensibilidade à CQ e amodiaquina em *P. falciparum* em mutantes *pfmdr1*Tyr86 sem o alelo mutado *pfcr1*Thr76.⁽⁴⁵⁾

Mutações nos codões 72 a 76 no *pfcr1* também estão envolvidas no processo de resistência à amodiaquina, nomeadamente a K76T. Aliás é possível que primeiro se acumulem polimorfismos no gene *pfcr1* e posteriormente no *pfmdr1*.^(15, 20, 43, 44)

1.3.2. Mecanismos de Resistência aos Aril-aminoalcoois

Os primeiros registos de resistência de *P. falciparum* à quinina surgem no Brasil e em África.⁽¹⁵⁾

O aparecimento de resistência à MQ surgiu maioritariamente nos locais onde tem sido amplamente utilizada (Tailândia e Camboja), aparecendo também em regiões onde a mesma nunca havia sido utilizada, o que demonstra a possibilidade de resistência cruzada com a quinina, halofantrina, lumefantrina e CQ.^(10, 15, 18)

A resistência à quinina, MQ e halofantrina está relacionada com mutações, amplificações ou aumento da expressão do gene *pfmdr1* e consequentemente alterações na Pgh-1, mas pensa-se que outros mecanismos possam estar também envolvidos.^(10, 15, 38, 46) Curiosamente em clones Dd2, associa-se a resistência à MQ por aumento da expressão de *pfmdr1*.⁽⁴⁷⁾

O gene *pfcr1* está também envolvido no mecanismo de resistência à quinina, por codificar para a proteína PfNHE que regula o pH citosólico e/ou vacuolar, tendo efeito na acumulação do fármaco no parasita.⁽⁷⁾

1.3.3. Mecanismos de Resistência aos Antifolatos

A base genética da resistência aos antifolatos consiste em mutações nos genes *dhfr* e *dhps*, afectando o sítio activo das enzimas DHFR e DHPS.⁽²⁵⁾

A resistência ao proguanil e pirimetamina surgiram rapidamente após a sua introdução no mercado, apresentando fenótipo resistente uma mutação pontual no gene *dhfr*.^(10, 15, 25) Na resistência à pirimetamina foram identificadas *in vitro* e em estudos de campo as mutações S108N, N51I, C59R e I164L.^(10, 15, 18) A combinação de mutações A16V/S108T e S108N/C59R/I164L promovem a resistência mais significativa ao cicloguanil.⁽¹⁰⁾ Por sua vez, a mutação N51I/C59R/S108N/I164L é refractária à pirimetamina e ao cicloguanil.^(10, 25)

Alterações da enzima DHFR resultam numa menor afinidade para o substrato/inibidor, mas numa hipersensibilidade às sulfonamidas e sulfonas, daí a utilização sinérgica de ambos os tipos de antifolatos.⁽¹⁵⁾

Em relação à resistência à sulfonamida, enumeram-se as mutações S436A, S436F, A437G, A581G, A613T, A613S, K540E/A437G, 436A/A437G/A613T e S436A/A437G/K540E no gene *dhps*.⁽¹⁰⁾ Mutações no gene *dhps* conferem resistência cruzada com a dapsona, o que mostra que o local de acção na enzima é o mesmo para as sulfonamidas e sulfonas.⁽¹⁰⁾

1.3.4. Mecanismos de Resistência à Artemisinina

Em 2003, Eckstein-Ludwig *et al*, descreveu o alvo que poderia conduzir à resistência à artemisinina, a enzima PfATP6.^(5, 7, 18) A mutação no resíduo de lisina no codão 263 perto do local de ligação do inibidor na PfATP6 pode alterar a sensibilidade à artemisinina.⁽⁷⁾ Na Guiana Francesa foram isoladas estirpes que demonstram redução da sensibilidade ao arteméter, associada a um polimorfismo S769N da PfATP6, que conduzia à mudança da conformação na proteína.⁽⁷⁾

Mutações pontuais ou alteração do número de cópias do gene *pfmdr1*, parecem ser igualmente responsáveis pela diminuição da susceptibilidade à artemisinina, como se verificou em estudos *in vitro* e num estudo de campo efectuado na Tailândia. Já mutações no gene *pfprt* mostraram conferir maior sensibilidade à artemisinina. No *P. chabaudi* identificou-se a sobreexpressão do gene *tctp* como o mecanismo responsável pela indução de resistência.^(5, 10)

Contrariamente, Afonso *et al* (2006), analisaram os genes *atp6*, *tctp*, *mdr-1* e o equivalente *pfprt* em clones resistentes ao *P. chabaudi* e não identificaram a associação de mutações nestes genes ao fenótipo de resistência à artemisinina.^(5, 10)

Mais recentemente, em 2008, no oeste do Camboja (Pailin) surgiu a diminuição da susceptibilidade ao artesunato *in vivo*. Nenhum dos marcadores *pfmdr1*, *pfcr1*, *pfSERCA* explicou o aparecimento deste fenótipo.⁽⁶⁾

1.3.4. Mecanismos de Resistência à Atovaquona

A utilização da atovaquona em monoterapia conduz a mutações no gene *pfCYTB* do parasita, que codifica para o citocromo b, localizado no genoma mitocondrial.^(16, 18, 38)

Em estudos de campo as mutações mais comuns localizaram-se no citocromo b (Y268S, Y268C ou Y268N). Estudos *in vitro* mostraram diferentes resultados, sendo visíveis mutações no codão 133 (M133I), no codão 271 (L271F) e em altas concentrações em posições 272, 275 e 280 juntamente com a M133I. Verificaram-se também, mas com menos frequência, mutações nas posições 267, 272, 280, 283 e 284.^(38, 48)

Devido à problemática da resistência à atovaquona utiliza-se este fármaco em combinação terapêutica com o proguanil.^(15, 18) O proguanil não tem efeito no STEM ou no potencial da membrana, contudo aumenta a habilidade da atovaquona colapsar o potencial de membrana.^(18, 25)

1.4. Agentes de Reversão da Resistência ou Quimiosensibilizadores

Os primeiros estudos de modelação da resistência a antimaláricos foram efectuados para a CQ.⁽⁵⁾ Dentro dos grupos de fármacos que possuem esta propriedade encontram-se os antidepressivos (imipramina (**29**) e desipramina (**30**)), bloqueadores dos canais de cálcio (verapamil (**31**)), agentes uricosúricos (probenecide (**32**)), inibidores antioxidantes como o dissufiram (**33**), indometacina (**34**) e acetaminofeno (**35**), e antifúngicos como o cetoconazol (**36**) (Figura 13).⁽¹²⁾

Os agentes de reversão da resistência à CQ, também denominados de quimiosensibilizadores à CQ, são normalmente moléculas anfipáticas (com regiões lipofílicas e carga positiva) que competem com esta no local de ligação ao PfCRT.^(25, 26)

Num estudo de Bhattacharjee *et al* (2002), foi desenvolvido um modelo de farmacóforo de reversores da resistência à CQ, a partir de 17 compostos, entre os quais a imipramina (**29**), desipramina (**30**) e 15 análogos. Dos 17 compostos a imipramina e a desipramina eram os que apresentavam valores de IC₅₀ mais baixos para o clone resistente à CQ de *P. falciparum* W2. O farmacóforo obtido possuía dois locais de interações hidrofóbicas aromáticas no anel tricíclico e uma ligação de hidrogénio no azoto da cadeia lateral. Cálculos quânticos determinaram que o **N5** do anel heterocíclico e o azoto secundário (ou terciário) terminal separado por dois a três carbonos era essencial para a reversão da resistência. O aumento da basicidade do **N5** do heterociclo e a lipofilia da molécula eram também importantes para a reversão da resistência.⁽⁴⁹⁾

Este modelo de farmacóforo é corroborado por outros estudos, nos quais referem a importância de dois anéis aromáticos planares hidrofóbicos e de um azoto (normalmente terciário) que estabelece uma ligação de hidrogénio com o grupo hidroxilo da serina e uma ponte iónica (após protonação no azoto) com o resíduo de aspartato no PfCRT.^(10, 26, 50)

Alguns estudos defendem que a mutação do gene *pfcr*t e consequente alteração da proteína PfCRT (K76T) provoca a inibição da ATPase-H⁺ tipo V resultando numa alcalinização do VD consequente da saída de H⁺ para o exterior do VD e do efluxo da CQ acoplada com o H⁺ (transporte activo).^(41, 51) Outros estudos sustentam a ideia que não existiam diferenças significativas do pH do VD entre parasitas sensíveis e resistentes à CQ.^{(40),(41)} O verapamil (**31**) (bloqueador dos canais de cálcio), por exemplo, inibe este transporte ao ligar-se ao transportador PfCRT, sendo um agente quimiosensibilizante.^(41, 51, 52) Este efeito foi visualizado também em estudos efectuados

em clones com mutações K76I e K76N (que conferem resistência à CQ), em que a quimiosensibilização ocorria devido ao grupo amina protonado do verapamil que prevenia o efluxo de CQ por compensar a perda do resíduo de lisina.^(10, 26, 38, 53)

Mais recentemente, Masseno *et al* (2009)⁽⁵¹⁾ estudaram o efeito modelador da resistência do verapamil e do probenecide **(32)** em diversos grupos de antimaláricos. Foram utilizados dois clones de *P. falciparum*, a V1S (resistente à CQ, pirimetamina e quinina) e 3D7 (sensível a todos os antimaláricos testados, excepto lumefantrina e primaquina). Os resultados deste estudo mostraram uma quimiosensibilização moderada pelo verapamil no clone V1S para a CQ, primaquina e lumefantrina. Já no caso da desetilamodiaquina e quinina a quimiosensibilização era pronunciada. Concluiu-se também que ocorria uma quimiosensibilização moderada pelo probenecide à CQ, primaquina, halofantrina (em V1S) e ao clorocicloguanil (em clones de *P. falciparum* sensíveis à CQ, 3D7); bem como de forma pronunciada à piperquina (em V1S) e à pirimetamina (em 3D7).⁽⁵¹⁾ O efeito de quimiosensibilização estava associado ao alelo mutado do gene *pfcr*, através da inibição do transporte de aniões orgânicos e talvez seja o mesmo mecanismo que provoca a inibição do efluxo de CQ.^(10, 26, 51, 54)

A quimiosensibilização do *P. falciparum* ao verapamil está ligada também a mutações no *pfmdr1*.^(26, 51) Sabe-se que a Pgh possui a capacidade de provocar o efluxo de fármacos citotóxicos em linhagens de células resistentes à quimioterapia e que o verapamil inibe a Pgh em células tumorais de mamíferos e provoca a quimiosensibilização à CQ.^(10, 12, 39) Já Hayward e seus colaboradores (2005)⁽⁵²⁾ reportaram que polimorfismos no gene *pfmdr1* influenciavam a susceptibilidade do parasita à actividade antimalárica intrínseca do verapamil, e que esta estava relacionada com o padrão de sensibilidade à MQ e halofantrina, mostrando um mecanismo de acção comum entre os fármacos. Contudo sabendo que o local de acção do verapamil e da MQ é comum no humano, talvez o mesmo aconteça no parasita, em que os dois fármacos interagem directamente com a Pgh-1 e que mutações afectem a sensibilidade dos compostos por influenciar esta interacção.⁽⁵²⁾

Latha *et al* (2010)⁽⁵⁵⁾ estudou o efeito da administração conjunta de verapamil e CQ em sessenta pacientes com malária. Verificou-se que o grupo em que foi administrado 40 mg de verapamil (2h após cada uma das 4 administração de CQ) os sintomas e a parasitémia desapareceram primeiro neste grupo, concluindo-se que existia um efeito sinérgico entre ambos os fármacos, sendo segura a sua utilização.⁽⁵⁵⁾

Outros fármacos como o dissulfuram **(33)**, indometacina **(34)** e acetaminofeno **(35)** são

também reversores da resistência a antimaláricos. Estes fármacos são inibidores antioxidantes, que aumentam indirectamente a actividade da CQ esgotando o nível de glutathione no *P. falciparum*, o que o torna mais susceptível ao stress oxidativo. Estudos *in vitro* efectuados em modelos de roedores verificaram a sinergia entre estes fármacos, a CQ e a amodiaquina, mas a reversão da resistência não era completa. Pensa-se que incompatibilidades em termos de farmacocinética estejam na base deste problema, já que a indometacina possui um tempo de semi-vida de 4-5h, o acetaminofeno de 2-3h e dissulfiram cerca de 2-5 dias em comparação com o tempo de semi-vida de 1-2 meses da CQ em seres humanos.⁽¹⁰⁾

Em 2005, Tripathi *et al* demonstrou a quimiosensibilização à MQ após administração de cetoconazol (**36**) a macacos Rhesus infectados com *P. knowlesi*. Noutro estudo, a combinação de MQ com cetoconazol (inibidor do CYP3A4) mostrou efeitos sinérgicos *in vitro* e que o cetoconazol possui a capacidade de modelar a sensibilidade do parasita à MQ. Esta evidência mostra que talvez o *P. falciparum* possua uma enzima semelhante ao CYP3A4 responsável pela resistência à MQ (por metabolização deste antimalárico numa molécula inactiva, a carboximefloquina). Contudo os inibidores do CYP possuem um efeito antimalárico ao inibirem a destoxificação do grupo heme, o que segundo Wisedpanichkij *et al* (2009)⁽⁴⁶⁾ poderá ter impacto neste processo ao invés da hipótese da existência de uma enzima semelhante ao CYP.⁽⁴⁶⁾ O facto de o cetoconazol competir com o local de acção da MQ, pode ser outro mecanismo pelo qual ocorre quimiosensibilização, realçando igualmente que o cetoconazol ao inibir o CYP3A4, diminui a velocidade de metabolização em carboximefloquina e aumenta a concentração de MQ sérica e consequentemente a sua acção.⁽⁴⁶⁾

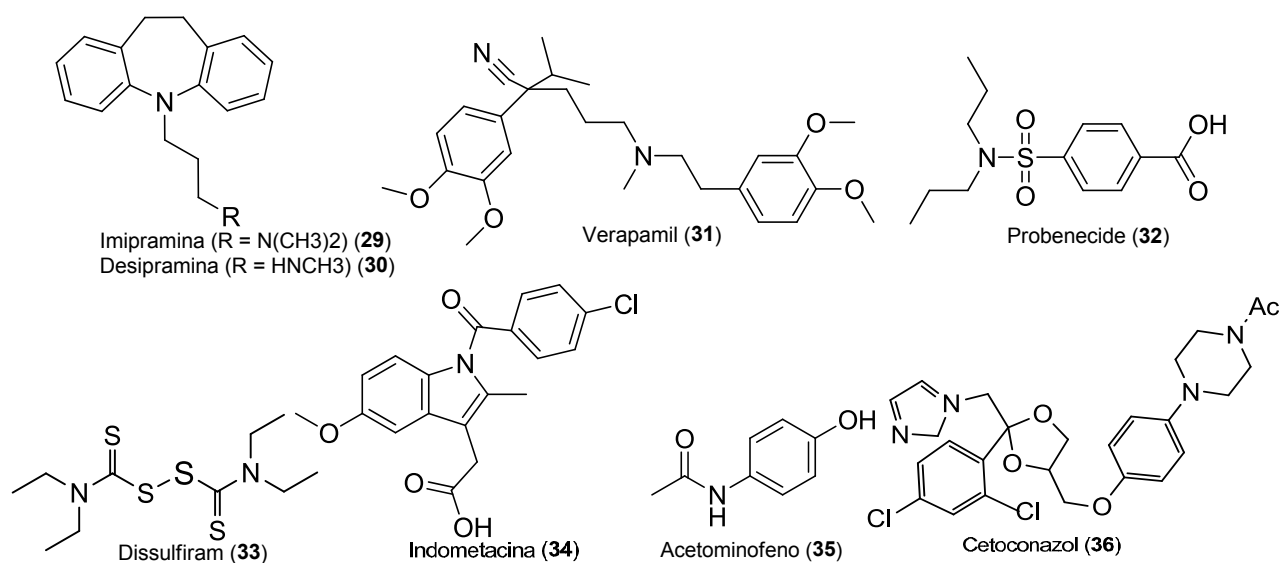


Figura 13. Compostos que revertem a resistência a antimaláricos.

Perante a acção reversora da resistência ou quimiosensibilizadora apresentada por diversos fármacos, vários investigadores têm investido no desenvolvimento e síntese de agentes reversores/quimiosensibilizadores aliados a uma maior eficácia e menores efeitos antipsicóticos, antihistamínicos ou cardiovasculares que estão inerentes à própria molécula.⁽⁵⁶⁾

Um exemplo disso foi o trabalho de Burgess *et al* (2006)⁽⁵⁷⁾, que partiu do núcleo da CQ ligando-o ao anel da imipramina, assim enquanto o núcleo da imipramina interferia com o efluxo da CQ, a CQ interagiu com o grupo heme. O protótipo mostrou ser promissor por inibir o crescimento de clones sensíveis à CQ de *P. falciparum* (D6) e clones resistentes Dd2. Apesar de a molécula apresentar hidrofobicidade, mostrou alguma biodisponibilidade oral no rato mas em doses superiores à CQ.⁽⁵⁷⁾

Guan *et al* (2002)⁽⁵⁶⁾ desenvolveu agentes quimiosensibilizadores à CQ (em clones em que a resistência está associada ao *pfmr1*), mas com efeitos colaterais reduzidos, derivados das fenotiazinas (**37**) e imipraminas (**38**) (Figura 14). Estudos de SAR mostraram que o alongamento da cadeia lateral alquílica da molécula retinha a actividade quimiosensibilizadora, sendo o composto com a cadeia de quatro carbonos com actividade superior. Foi também verificado que análogos com o núcleo da fenotiazina (X = S, **37**) exibiram melhor actividade quimiosensibilizadora entre os quatro anéis diferentes examinados (fenotiazínico (X = S, **37**), iminodibenzílico (X = C₂H₄, **38**), difenilamínico (sem X, **39**) e iminostilbeno (X = C₂H₂, **40**). O aumento do tamanho dos substituintes R₁ e R₂ do grupo amina estava associado à perda de actividade reversora da resistência. Estudos *in vitro* mostraram que estes compostos apresentaram maior actividade de quimiosensibilização em clones resistentes à CQ do que MQ, sendo o derivado da fenotiazina cujos grupos R₁ e R₂ correspondiam ao pirrolidinil o que apresentou maior actividade de quimiosensibilização⁽⁵⁶⁾. A actividade de quimiosensibilização dos compostos consistia na interacção com a calmodulina^(39, 56). O sítio activo desta proteína apresenta uma bolsa hidrofóbica com dois resíduos aromáticos de fenilalanina que interage com o núcleo tricíclico e uma região hidrofílica, composta por três resíduos de ácido glutâmico que estabelecia ligações com o azoto carregado positivamente da cadeia alifática^(39, 56).

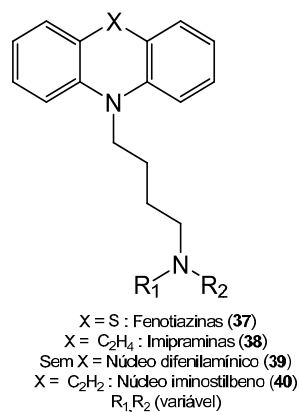
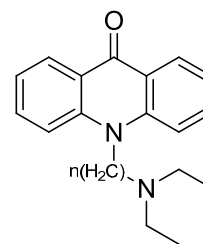


Figura 14. Estrutura dos compostos sintetizados por Guan *et al* (2002).

Já Kelly *et al* (2007)⁽⁵⁸⁾ sintetizou análogos de acridonas (**41**) (Figura 15), cuja cadeia alifática ligada a **N10**, continha 2 ou mais carbonos e terminava numa amina terciária. A acridona competia com a CQ no local de acção da PfCRT, reduzindo o efluxo desta para o citoplasma, restabelecendo a carga positiva do K76 com o grupo amina protonado. Análogos da acridona mostraram, desta forma, a capacidade de reverter a resistência à CQ e quinina. O melhor análogo possuía 6

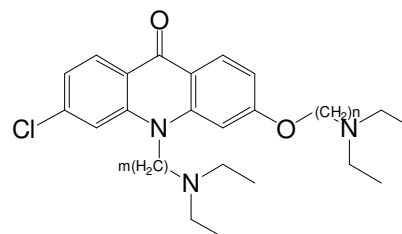


10-N-alkilamina acridonas (**41**)

Figura 15. Compostos sintetizados por Kelly *et al* (2007).

carbonos entre o azoto do hetrociclo e o da amina, apresentando maior actividade quimiosensibilizadora que o verapamil e de igual magnitude à desipramina; tendo a vantagem de não afectar o *uptake* da serotonina e norepinefrina e ter baixos efeitos antihistamínicos.⁽⁵⁸⁾

Em 2009, Kelly *et al*⁽¹³⁾, sintetizou análogos da acridona (**42**) (Figura 16), compostos com carácter bifuncional, nomeadamente com um núcleo de acridona (cujo alvo terapêutico era o heme) e um componente quimiosensibilizador a fármacos antimaláricos quinolínicos em clones *P. falciparum* Dd2 (MDR - *multiple drug resistance*). O composto, cujo *n* e *m* era igual a 2, mostrou ser bastante activo em clones sensíveis e multiresistentes de *P. falciparum*, com elevada eficácia e segurança *in vivo*. Este composto evidenciou sinergia com CQ, amodiaquina, quinina e piperquina em clones MDR de *P. falciparum* Dd2 e para a quinina também em clones sensíveis de *P. falciparum*.⁽¹³⁾



Análogos bifuncionais da acridona (**42**)

Figura 16. Compostos sintetizados por Kelly *et al* (2009).

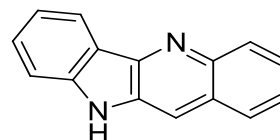
Capítulo 2

Indolo[3,2-*b*]quinolinas, uma Potencial Nova Classe Química de Antimaláricos

2.1. Indoloquinolinas de Origem Natural

Dado o aparecimento de resistências a quase todos os antimaláricos usados, torna-se necessário a procura de novos tratamentos.⁽⁴⁻⁶⁾ Os produtos naturais são bastantes promissores nesta área, sendo os alcalóides indólicos uma classe representativa com actividade antiplasmodial.⁽⁵⁹⁾

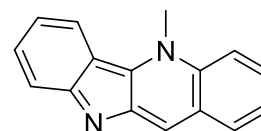
A estrutura tetracíclica da 10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolina (quindolina) (**43**, Figura 17) constitui uma molécula com diversas actividades biológicas⁽⁶⁰⁻⁶²⁾. As indoloquinolinas são alcalóides tetracíclicos naturais caracterizados pela fusão de um grupo indole com uma quinolina, encontrados quase exclusivamente numa trepadeira africana, a *Cryptolepis sanguinolenta*^(59, 62). Inicialmente esta planta era usada na medicina tradicional no tratamento da malária, doenças infecciosas, asma e febre na África Central e Ocidental^(60, 63).



Quindolina (**43**)

Figura 17. Quindolina.

A introdução de um grupo metilo no **N5** de **43** conduz à criptolepina (**44**, Figura 18), 100 vezes mais activa que a quindolina para clones resistentes à CQ de *P. falciparum*^(60, 63). Esta molécula foi sintetizada em 1906 por Fichter e Boehringer, mas isolada só em 1929 a partir das raízes da *C. triangularis* e mais tarde, em 1951, na *C. sanguinolenta*. Foi-lhe atribuída actividade antibacteriana, anti-hiperglicimante, antifúngica, anti-inflamatória e anti-tumoral.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾



Criptolepina (**44**)

Figura 18. Criptolepina.

A criptolepina foi igualmente identificada na espécie *Sida acuta* (Malvaceae) e *Microphilis guianensis* (Sapotaceae).^(60, 63)

A partir da *C. sanguinolenta* foram reportados mais alcalóides entre os quais (Figura 19), 5-metil-5*H*-indolo[3,2-*c*]quinolina (isocriptolepina ou criptosanguinolentina, **45**), 5-metil-5*H*-indolo[2,3-*b*]quinolina (neocriptolepina ou criptotaqueina, **46**), quindolina (**1**) e o seu derivado 5-metil (criptolepinona), criptospirelepina (**47**), bis-criptolepina (**48**), criptolepicarbolina (**49**), criptomisrina (**50**), 11-isopropilcriptolepina (**44f**).^(14, 64, 67)

Da espécie *Sida acuta* também foram isolados, para além da criptolepina, a quindolina, quindolinona, criptolepinona e 11-metoxi-quindolina.^(63, 68)

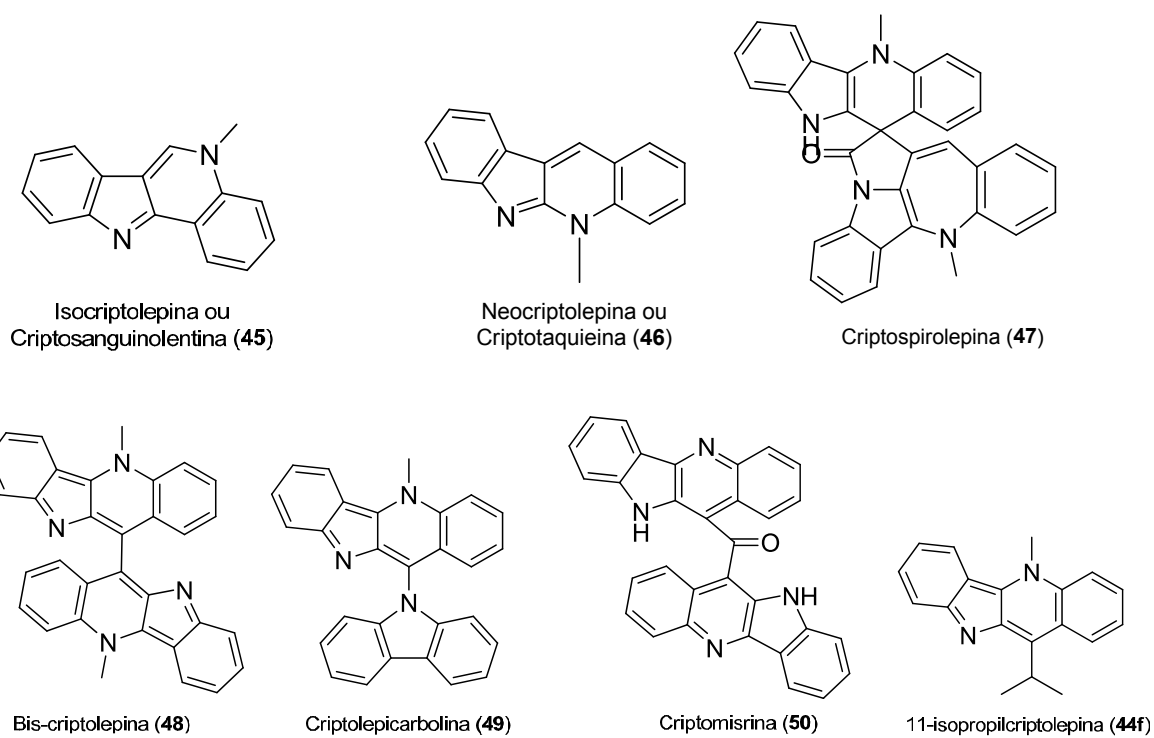
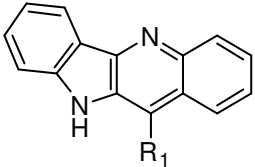


Figura 19. Outros alcalóides existentes na planta *Cryptolepis sanguinolenta*.

2.2. Actividade Antimalária de Indolo[3,2-*b*]quinolinas e seus Derivados

As indolo[3,2-*b*]quinolinas, especificamente a quindolina (**43**) e criptolepina (**44**) têm sido estudadas como protótipos na síntese de novos análogos, devido à sua capacidade de derivatização. A quindolina mostrou uma baixa ou até mesmo nenhuma actividade biológica em vários sistemas.⁽⁶²⁾ Em estirpes de *P. falciparum* K1 a quindolina e derivados alquilados em **C11** demonstraram ser inactivos (Figura 20).⁽⁶⁹⁾



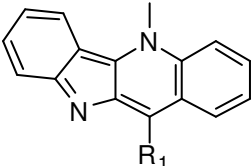
IC ₅₀ nM (<i>P.f.</i> K1)	
43 : R1 = H	36200
43a : R1 = Me	74600
43b : R1 = Et	30900
43c : R1 = C ₆ H ₅	74600

Figura 20. Actividade antimalária da quindolina e seus derivados. [adaptado de (69) e com a devida autorização dos autores]

A criptolepina apresentou um amplo espectro de propriedades biológicas, destacando-se a actividade antimalária.⁽⁶²⁾ A criptolepina possui actividade antimalária em clones sensíveis e resistentes à CQ, apresentando contudo resistência cruzada com a CQ.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾ Pensa-se que a criptolepina se ligue aos cristais de hemozoína, inibindo o seu crescimento, aumentando a acumulação de hemes livres tóxicos no VD do parasita.^(59, 66, 70) Contudo foi também descrito que a criptolepina acumula-se no núcleo dos esquizontes, intercalando com o DNA (especificamente nas sequências do par de bases GC, alterando a conformação da hélice) e interferindo com a replicação do DNA.^(66, 68)

Este composto actua na fase sanguínea do parasita, apresentando um IC₅₀ de 755 nM em clones resistentes de *P. falciparum* W2, citotoxicidade em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) de 1180 nM e uma actividade antimalária *in vivo* de ED50 < 50 mg/kg p.o. e ED50 = 10 mg/kg i.p. no modelo roedor.^(59, 71) Apesar de ser bastante activa, a criptolepina é tóxica através da administração intra-peritonal (e inactiva via oral), devido à sua actividade na síntese de DNA, daí a sua não utilização clínica.^(64, 68, 70)

Observou-se que a introdução de grupos acídicos em **C11** da criptolepina (**44a** e **44b**) anulavam a actividade antimalárica, mas com a esterificação do grupo carboxílico (**44c**) obtinha-se um composto com alguma actividade. A introdução de cadeias alquílicas em **C11** conduz a compostos forte a fracamente activos, **44d** a **44g** (Figura 21).



IC ₅₀ nM (<i>P.f. K1</i>)	
44a : R1 = OH	120000
44b : R1 = COOH	> 181000
44c : R1 = COOEt	3760
44d : R1 = Me	101
44e : R1 = Et	1100
44f : R1 = <i>i</i> Pr	2200
44g : R1 = C ₆ H ₆	1100

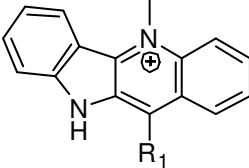
Figura 21. Actividade antimalárica de derivados da criptolepina. [adaptado de (69) e com a devida autorização dos autores]

A incorporação de uma cadeia básica no **C11** da criptolepina demonstrou aumentar a actividade antimalárica e selectividade para o parasita, possivelmente devido ao aumento da acumulação do mesmo no VD.^(66, 71) Perante este facto e devido à citotoxicidade observada para a criptolepina, Lavrado *et al* (2008 e 2010)^(66, 71) sintetizou uma série de análogos da criptolepina. Com a introdução de cadeias de diaminoalcanos (-NH-linker-NR₁R₂) no **C11** obteve derivados com uma actividade antimalárica elevada, com IC₅₀ que variavam entre 20-455 nM em clones de *P. falciparum* W2, com citotoxicidade menor que a criptolepina e maior selectividade para o parasita (Figura 22).^(66, 69, 71)

Estudos de SAR demonstraram que derivados da criptolepina com uma amina terminal secundária ou terciária são bastante activos, com IC₅₀ na ordem dos 20-90 nM. Verificou-se que cadeias propilo, butilo e cicloalquilo diamina na posição **C11** aumentavam significativamente a actividade antimalárica em culturas de *P. falciparum* resistentes, diminuindo a citotoxicidade relativamente à criptolepina. Já cadeias ramificadas conduziam à redução da actividade antimalárica. A cadeia de piperidina apresentava uma alta actividade antimalárica em ambos os fenótipos, sugerindo que o constrangimento conformacional entre o azoto distal e o azoto do núcleo da criptolepina aumentava a actividade. A cadeia 2-dietil-aminometilfenol, presente

também na amodiaquina, aumentava a actividade antimalárica, possivelmente devido à ponte de hidrogénio entre a amina protonada (dador) e o grupo hidroxil (aceitador). A introdução de substituintes electro-atractores, como o cloro, no núcleo da criptolepina não alterava significativamente a actividade antimalárica, quando a cadeia alquildiamina estava na posição **C11**.^{(66, (71)}

O índice de selectividade (razão entre citotoxicidade e actividade antimalárica em clone W2) da maioria dos derivados foi superior a 10, o que indica alguma selectividade para o parasita. O derivado **51d** (R = NH-4-piperidina) foi o composto que apresentou um índice de selectividade superior.⁽⁷¹⁾

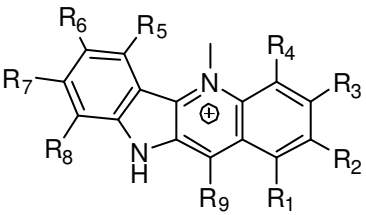


	IC ₅₀ nM (P.f. W2)
51 : R ₁ = H	755
51a : R ₁ = NH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	50
51b : R ₁ = NH(CH ₂) ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂	82
51c : R ₁ = NHCH(CH ₃)CH ₂ N(CH ₃) ₂	132
51d : R ₁ = NH-4-piperidina	44
51e : R ₁ = NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	30
51f : R ₁ = NH(CH ₂) ₃ N(CH ₂ CH ₃) ₂	32
51g : R ₁ = NHCH ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	184
51h : R ₁ = NH(CH ₂) ₃ NHCH(CH ₃) ₂	22
51i : R ₁ = NH(CH ₂) ₃ N-piperidina	36
51g : R ₁ = NHCH(CH ₃)(CH ₂) ₃ N(CH ₂ CH ₃) ₂	127

Figura 22. Actividade antimalárica de derivados da criptolepina sintetizados por Lavrado *et al* (2008 e 2010)^(66, 71). [adaptado de (69) e com a devida autorização dos autores]

Quando se substitui a posição **C2** ou **C7** da criptolepina por bromo (**52a** ou **52b**) obtêm-se compostos mais activos que **51** em estirpes de *P. falciparum* K1. Já a dibromação, 2,7-dicbromo-criptolepina **52c**, conduz a compostos 10 vezes mais activos que **51** (Figura 23). Já Wright *et al* (2001) sintetizou compostos que possuíam um valor de IC₅₀ em estirpes de *P. falciparum* K1 inferior a 100 nM (**52l**, **52q**, **52v**, **52x**, **52y** e **52z**, Figura 23) contudo apresentaram ser apenas 2 a 4 vezes menos citotóxicos que **51**.^(69, 70, 72)

Já a bis-criptolepina **48**, uma indoloquinolina dimérica, demonstrou ser mais activa que **51**, em estirpes de *P. falciparum* K1, com um IC₅₀ de 270 nM.⁽⁶⁹⁾



	IC ₅₀ nM (P.f. K1)
51: Cripolepina	440
52a: R ₂ = Br	260
52b: R ₆ = Br	260
52c: R ₂ = Br; R ₆ = Br	49
52d: R ₆ = NO ₂	650
52e: R ₈ = NO ₂	6920
52f: R ₆ = NO ₂ ; R ₈ = NO ₂	650
52g: R ₉ = Cl	240
52h: R ₂ = Br; R ₉ = Cl	4750
52i: R ₇ = Br; R ₉ = Cl	7180
52j: R ₆ = Cl; R ₉ = Cl	7620
52k: R ₇ = Cl; R ₉ = Cl	27000
52l: R ₁ = Cl; R ₂ = Cl	88
52m: R ₂ = Cl	166
52n: R ₃ = Cl	448
52o: R ₂ = Cl; R ₃ = Cl	356
52p: R ₄ = Cl	4690
52q: R ₇ = Cl	>1000
52r: R ₂ = F	1210
52s: R ₂ = CH ₃	410
52t: R ₂ = OCH ₃	950
52u: R ₃ = CH ₃	149
52v: R ₂ = Cl; R ₆ = Br	30
52x: R ₂ = F; R ₆ = Br	63
52y: R ₃ = Cl; R ₆ = Br	37
52w: R ₃ = CH ₃ ; R ₆ = Br	260
52z: R ₂ = Cl; R ₇ = Cl	45

Na ausência da descrição dos R, consta um hidrogénio

Figura 23. Actividade antimalária de derivados da criptolepina sintetizados por Wright *et al* (2001)^(70, 72).
[adaptado de (69) e com a devida autorização dos autores]

A quindolona (**1**) e a 3,7-dicloroquindolona (**2**) apresentaram um IC₅₀ superior a 10 µM em clones resistentes à CQ de *P. falciparum* W2.⁽¹⁴⁾ Também a criptolepinona demonstrou ser inactiva contra parasitas CQ resistentes de *P. falciparum* K1, contudo pensa-se que a sua estrutura tetracíclica aromática e o carbonilo que estabelece pontes de hidrogénio (aceitador de hidrogénio) são características estruturais necessárias para a ligação ao grupo heme ou hemozoína.^(14, 67)

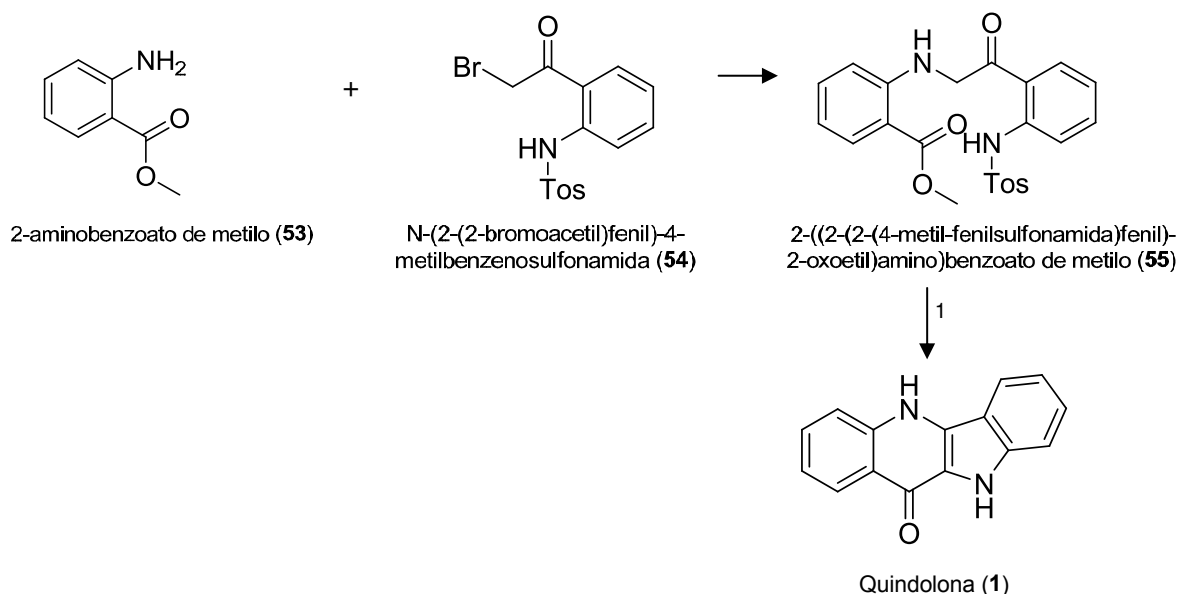
Sabendo que a quindolona possui três grupos nucleófilos, **N5**, **N10** e **O11**, Lavrado *et al* (2010) sintetizou derivados bis-alquilamina de quindolona que mostraram poder interferir na destoxificação do grupo heme, no VD do parasita.⁽¹⁴⁾ Sugere-se que a introdução de duas cadeias alquilamina contribuiu para uma maior percentagem de acumulação no VD, onde ocorre a ionização da amina (base fraca, que possui pKa entre 8 e 10).⁽⁷³⁾

2.3. Métodos de Síntese de Indoloquinolinas

Devido ao interesse associado às propriedades biológicas das indolo[3,2-*b*]quinolinas, diversas sínteses foram desenvolvidas para a quindolina e análogos. Lavrado *et al* (2011)⁽⁶²⁾ descreve exaustivamente dez diferentes sínteses destes compostos.

Nesta tese vai-se apenas descrever a síntese desenvolvida por Görlitzer e Weber (1981) e adaptada por Bierer (1998), que foi a utilizada na síntese de quindolonas.

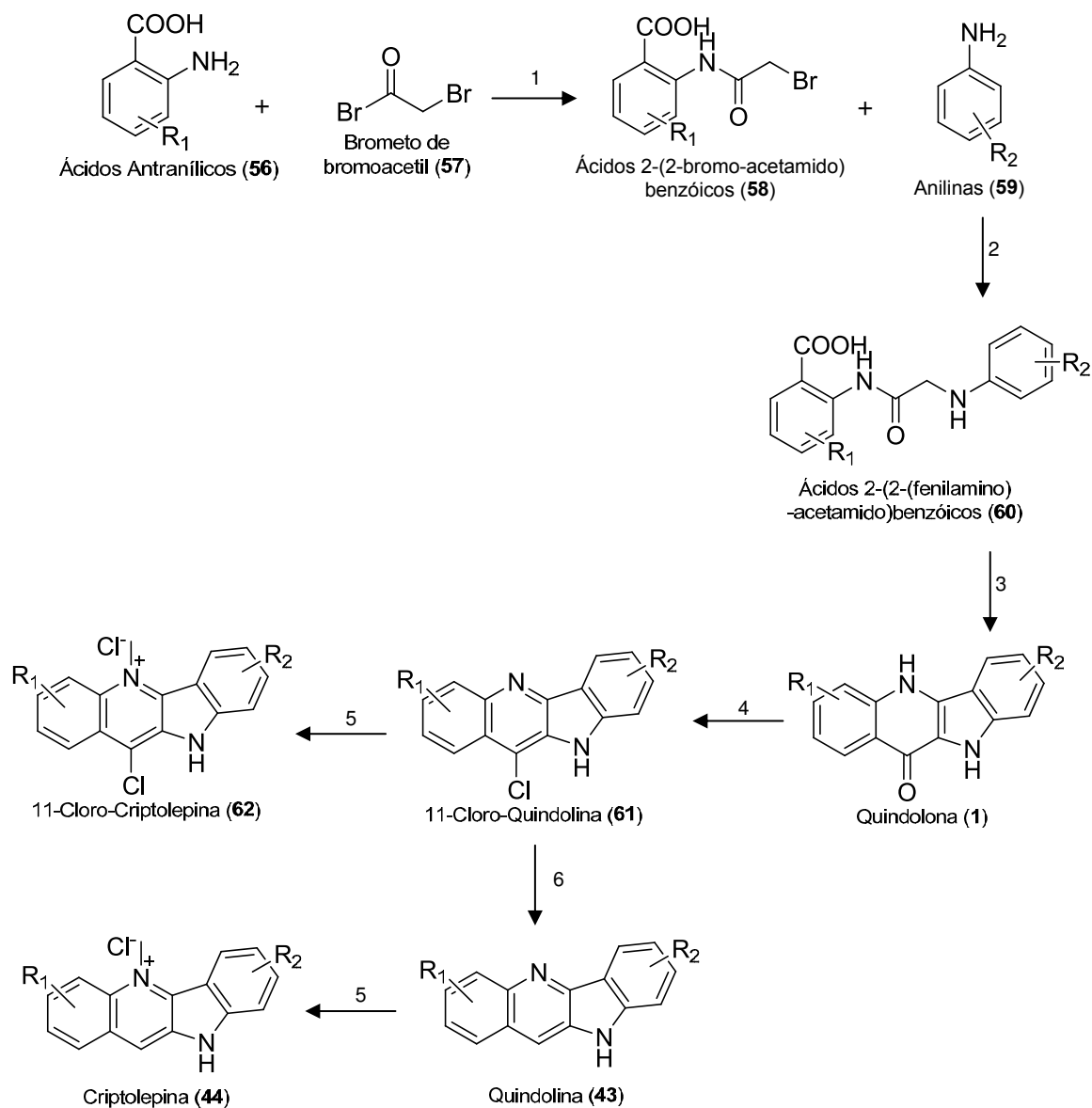
Em 1981, Görlitzer e Weber (Esquema 3) sintetizaram o núcleo indolo[3,2-*b*]quinolina, através de uma substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2) entre 2-aminobenzoato de metilo (**53**) e N-(2-(2-bromoacetil)fenil)-4-metilbenzenosulfonamida (**54**). A amina do intermediário obtido (**55**) é desprotegida com metanolato de sódio, ocorrendo posteriormente a ciclização dupla intramolecular térmica pelo PPA, formando a quindolona (**1**).^(62, 74, 75)



Esquema 3. Síntese da quindolona por Görlitzer e Weber (1981). 1. a) NaOMe, b) PPA.

Bierer e seus colegas (1998)⁽⁶⁵⁾ adaptaram a síntese de quindolonas (Esquema 4). Um ácido antranílico (**56**) é tratado com brometo de bromoacetilo (**57**), formando o correspondente derivado de bromoacetilo (**58**) que quando reage com uma anilina (**59**) obtém-se ácidos 2-(2-(fenilamino)-acetamido)benzóicos (**60**). A ciclização intramolecular de **60** catalizada por ácido polifosfórico (PPA) origina a quindolona (**1**).^(62, 64-66)

A 11-cloro-quindolina (**61**) é posteriormente obtida após cloração no **C11** com POCl_3 (oxicloreto de fósforo) originando a quindolina (**43**) após hidrogenação catalítica de forma a remover o cloro. Posterior à reacção de **61** ou **43** com agentes de metilação, ocorre N-alquilação, originando respectivamente a 11-cloro-criptolepina (**62**) e a criptolepina (**44**) (Esquema 4).^(61, 64-66)



Esquema 4. Síntese da quindolina. 1. DMF/1,4-Dioxano, r.t., Overnight; 2. DMF, 120°C, 48 h; 3. PPA, 2h, 130 °C; 4. POCl_3 , Refluxo, 2 horas; 5. MeOTf , Na_2CO_3 , r.t., 24 horas, HCl . 6. H_2 , Pd/C , EtOH . $\text{R}_1 = \text{H, F, Cl, OMe}$ e $\text{R}^2 = \text{H, F, Br, Cl, Me, OMe, COOH}$.

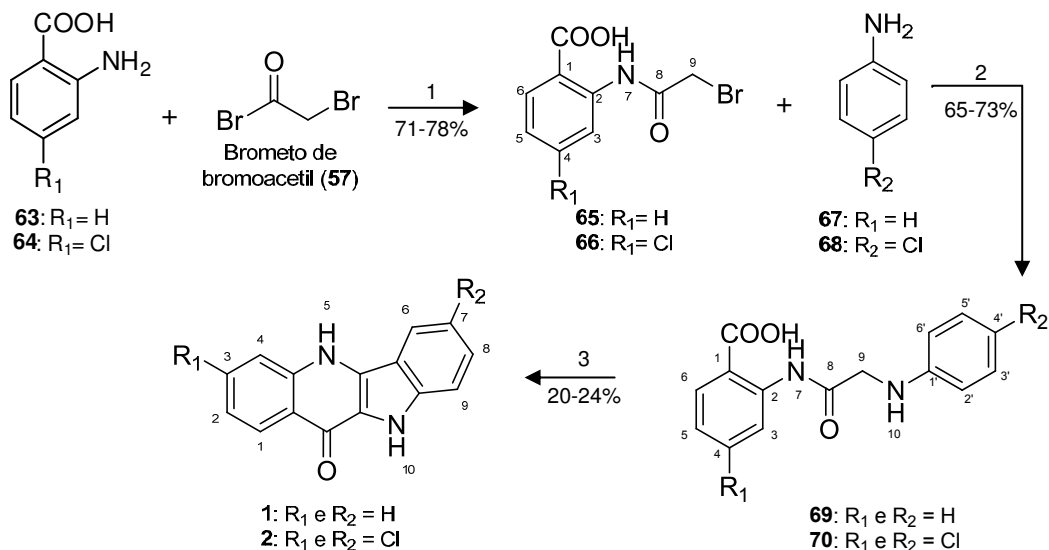
Capítulo 3

Apresentação e Discussão de Resultados

3.1. Síntese de Derivados Bis-alquilamina de Quindolonas

3.1.1. Síntese de 5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-onas

A síntese de Görlitzer e Weber, adaptada por Bierer, foi a metodologia adoptada na síntese do núcleo tetracíclico de 5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-onas (quindolonas), devido à simplicidade da síntese e relativo baixo preço dos reagentes (Esquema 5).^(14, 62)



Esquema 5. Síntese de quindolonas. 1. DMF/1,4-Dioxano (1:1), r.t., Overnight; 2. DMF, 120°C, 48 h; 3. PPA, 2h, 130 °C.

A síntese inicia-se com uma reacção de substituição nucleofílica entre o grupo amina do ácido antranílico (**63**, **64**) e o grupo carbonilo do brometo de bromoacetil (**57**), libertando-se o ião brometo e obtendo-se o composto **65** ou **66**, com rendimentos de 78,0% e 71,2% respectivamente (Esquema 5, passo 1).

Procedeu-se à caracterização dos compostos **65** e **66** por técnicas de ressonância magnética nuclear de protão (¹H-RMN) (Anexo I e Anexo II, respectivamente), espectroscopia de correlação homonuclear de protão-protão (COSY) (Anexo I e Anexo II) e ponto de fusão (p.f.). Os resultados espectroscópios (Tabela 1 e secção 5.4.1.) encontram-se de acordo com a respectiva estrutura química e dados disponíveis na literatura.^(66, 73)

A atribuição dos desvios químicos dos protões destes compostos (bem como dos compostos **69**, **70**, **1** e **2**) foi efectuada com base na informação dos espectros de ¹H-

RMN, sendo as correlações visíveis nos respectivos espectros de COSY, comparando com os dados experimentais disponíveis.^(66, 73)

Os valores de p.f. dos compostos apresentam um intervalo de 2-3°C, o que indica a elevada pureza dos compostos.

O espectro de ¹H-RMN dos compostos **65** e **66** apresenta um singuleto com um desvio químico de 11,61 ppm e 11,72 ppm, respectivamente, correspondentes ao protão do grupo amida (**H7**). A presença de outro singuleto, com integração de dois protões, no espectro do composto **65** a 4,26 ppm e a 4,29 ppm no espectro do composto **66**, demonstra a presença do CH₂ do grupo acetilo (**H9**) do composto pretendido.

Na zona do espectro correspondente aos sinais dos protões aromáticos do composto **65**, surgem quatro sinais entre os 7,22 ppm e os 8,45 ppm, correspondendo a quatro protões aromáticos. A multiplicidade apresentada pelos sinais (Tabela 1) confirma a estrutura do composto, já que a 7,63 ppm surge um duplo duplete (**H4**), com acoplamento *orto* com o protão **H3** ($J = 8,1$ Hz) e **H5** ($J = 8,8$ Hz), sendo que os sinais apresentam no espectro de COSY correlações entre si. O sinal duplo duplete a 7,22 ppm, **H5**, possui acoplamento *orto* com o protão **H4** ($J = 8,8$ Hz) e **H6** ($J = 7,8$ Hz), também correlacionados entre si no espectro de COSY. Surgem ainda dois dupletos, um a 8,45 ppm (**H3**) e outro a 8,01 ppm (**H6**) com acoplamento *orto* com **H4** e **H5**, respectivamente (Tabela 1).

O espectro do composto **66** apresenta três sinais entre os 7,29 ppm e os 8,56 ppm. O sinal do protão a 8,56 ppm (**H3**), surge como um singuleto, mas na realidade este sinal deveria aparecer como um duplete, com uma constante de acoplamento com **H5** em *meta* de aproximadamente 2 Hz. Como dupletos, surgem os sinais dos protões **H6** a 8,01 ppm e **H5** a 7,29 ppm, relacionados entre si no espectro de COSY por uma constante de acoplamento *orto* de $J = 8,8$ Hz (Tabela 1). No entanto o protão **H5** deveria aparecer como um duplo duplete, acoplado ao **H6** em *orto* ($J = 8,8$ Hz) e **H3** em *meta* ($J \approx 2$ Hz).

No passo seguinte, fez-se reagir o composto **65** e **66** com a anilina (**67**) ou a 4-cloro-anilina (**68**), obtendo-se os compostos **69** e **70** com rendimentos de 72,7% e 64,7%, respectivamente. A reacção do tipo SN₂ ocorre entre o grupo amina da anilina e o carbono α de **65** e **66**, libertando-se como bom grupo abandonante o ião brometo (Esquema 3, passo 2). A diferença de rendimentos entre ambas as sínteses deve-se ao facto de a 4-cloro-anilina ser um nucleófilo mais fraco que a anilina, devido ao efeito electroatractor do cloro na posição *para*.

A caracterização dos compostos **69** e **70** pelas técnicas de ^1H -RMN (Anexo III e IV, respectivamente), COSY (Anexo III e IV,) e p.f. revelou resultados espectroscópicos que estão de acordo com a estrutura química dos compostos e literatura (Tabela 1 e seção 5.4.2.).^(65, 66) Os valores de p.f. apresentam um intervalo de 2°C, indicando compostos com elevado grau de pureza.

No espectro do composto **69**, os sinais compreendidos entre 6,59 ppm e 8,73 ppm indicam a presença dos correspondentes nove prótons aromáticos. A confirmação da síntese do produto desejado, **69**, é dada pela presença de um duplo duplete a 7,10 ppm, correspondente ao sinal dos prótons **H3'** e **H5'**, com acoplamento com os sinais **H2'** e **H6'** em *orto* com uma constante de 7,6 Hz, bem como acoplamento *orto* com o sinal do próton **H4'** a 6,62 ppm ($J = 7,2$ Hz), correlacionados entre si no espectro de COSY; a 6,62 ppm pelo duplete **H4'**, acoplado com **H3'** e **H5'**, com $J = 7,2$ Hz, e pelo sinal a 6,59 ppm, com integração correspondendo aos prótons **H2'** e **H6'**, acoplados em *orto* com **H3'** e **H5'**, de $J = 7,6$ Hz. Os singuletos a 12,02 ppm e 6,50 ppm foram atribuídos aos prótons da amida e da amina, respectivamente. O sinal a 3,83 ppm corresponde aos prótons alifáticos (CH_2) da acetamida (**H9**) e surge como um duplete, uma vez que os prótons **H9** são diastereotópicos, com uma constante de acoplamento geminal de $J = 4,3$ Hz. Os sinais dos prótons **H3** e **H6** observados no espectro de ^1H -RMN do composto **69** são semelhantes aos apresentados para o composto **65**, surgindo como dupletos, acontecendo o mesmo com o próton **H4**, que surge como duplo duplete. O **H5** aparece como um multipeto, devendo corresponder a duplo duplete, com acoplamento com os sinais **H4** e **H6** em *orto* e constantes de acoplamento de aproximadamente 8 Hz (Figura 24). Este sinal multipeto deve-se à sobreposição do sinal **H3'** e **H5'**.

Já no espectro de ^1H -RMN do composto **70** surgem sinais entre 6,60 ppm e 8,81 ppm, correspondentes a sete prótons aromáticos. Dois dupletos correspondem aos prótons aromáticos da 4-cloroanilina, com acoplamento *orto* entre si, $J = 8,8$ Hz: a 7,13 ppm surgem os prótons **H3'** e **H5'** e a 6,60 ppm os sinais correspondentes ao **H2'** e **H6'**. Os singuletos a 12,08 ppm e 6,73 ppm correspondem aos prótons da amida e da amina, por esta ordem. O duplete a 3,87 ppm corresponde aos prótons da acetamida (**H9**), com uma constante de acoplamento de 5,6 Hz. O sinal a 8,81 ppm, **H3**, surge como um duplete com acoplamento com **H5** em *meta* ($J = 2,2$ Hz). O próton **H6** a 7,95 ppm corresponde a um duplete com acoplamento com **H5** em *orto* ($J = 8,5$ Hz) e o próton **H5** aparece como sinal duplo duplete a 7,22 ppm, com acoplamento *orto* com **H6** e acoplamento com o **H3** em *meta* (Tabela 1).

Tabela 1. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN para os compostos **65**, **66**, **69** e **70**

δ (ppm), multiplicidade, número de prótons				
Posição dos H	65	66	69	70
1				
2				
3	8,45 (d, 1H)	8,56 (s, 1H)	8,73 (d, 1H)	8,81 (d, 1H)
4	7,63 (dd, 1H)		7,60 (dd, 1H)	
5	7,22 (dd, 1H)	7,29 (d, 1H)	7,14 (m, 1H)	7,22 (dd, 1H)
6	8,01 (d, 1H)	8,01 (d, 1H)	7,94 (d, 1H)	7,95 (d, 1H)
7	11,61 (s, 1H)	11,72, (s, 1H)	12,02 (s, 1H)	12,08 (s, 1H)
8				
9	4,26 (s, 2H)	4,29 (s, 2H)	3,83 (d, 2H)	3,87 (d, 2H)
10			6,50 (s, 1H)	6,73 (s, 1H)
1'				
2'			6,59 (d, 1H)	6,60 (d, 1H)
3'			7,10 (dd, 1H)	7,13 (d, 1H)
4'			6,62 (d, 1H)	
5'			7,10 (dd, 1H)	7,13 (d, 1H)
6'			6,59 (d, 1H)	6,60 (d, 1H)

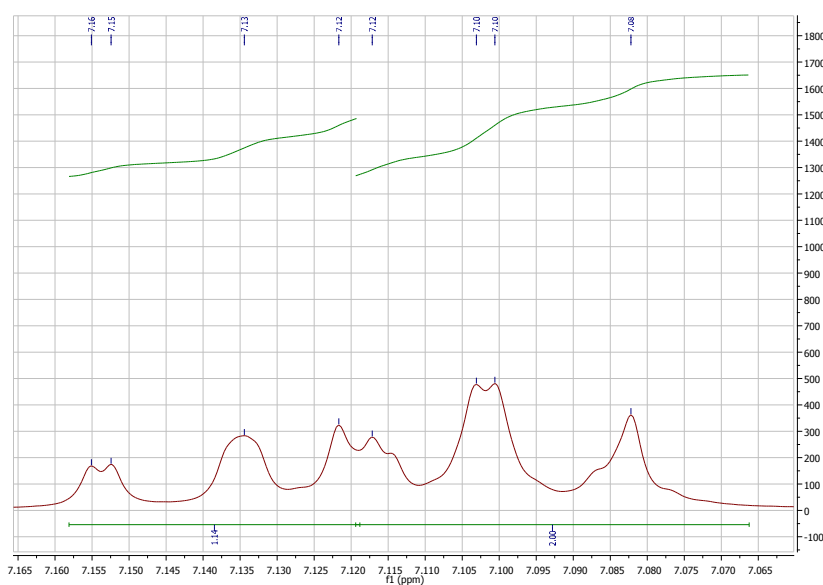


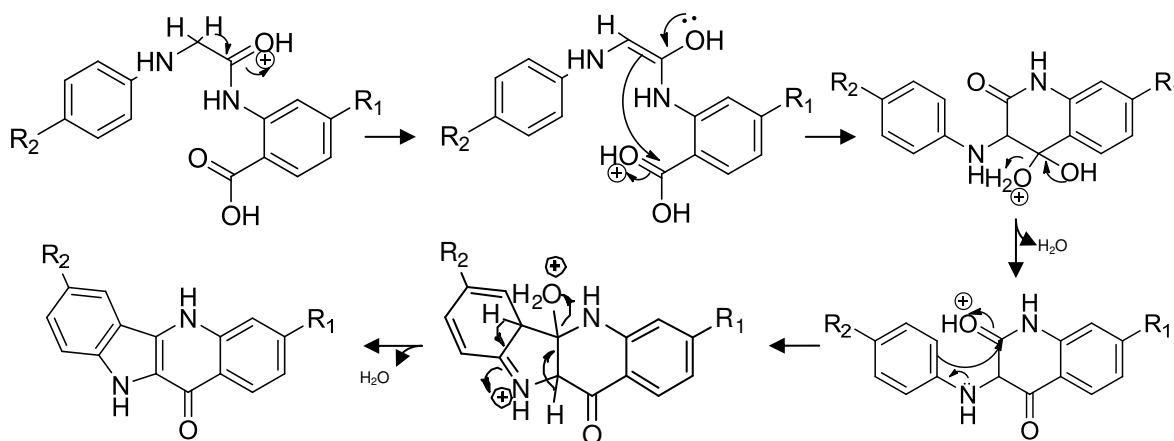
Figura 24. Ampliação entre os 7,06 ppm e 7,16 ppm do espectro de ^1H -RMN do composto **69**.

A formação de **1** (η bruto = 33,6 %, η puro = 23,9%) ou **2** (η bruto = 49,2%, η puro = 20,5%) ocorre por dupla ciclização de **69** ou **70**, respectivamente, em meio ácido. Através da análise dos rendimentos brutos de ambos os compostos verificou-se que, após a respectiva síntese, é necessária uma purificação e que provavelmente as impurezas serão derivadas dos compostos **69** ou **70**.

A reacção é catalizada pelo ácido polifosfórico (PPA), sendo o mecanismo proposto no Esquema 6⁽⁷²⁾. O PPA apresenta uma óptima solubilidade para compostos orgânicos, é dador de prótons, promove a desidratação de compostos e a ciclização intramolecular dentro de um vasto leque de temperaturas, o que faz com que seja utilizado em diversas sínteses de compostos cíclicos.^(73, 76)

O mecanismo proposto por Lavrado *et al* (2010)⁽⁷²⁾ (Esquema 6) inicia-se com a formação de um enol (equilíbrio ceto-enólico) entre o carbono α e o carbonilo do grupo acetamina. O carbono α (nucleofílico) reage com o carbono carbonílico do grupo ácido carboxílico, formando o anel de 6 membros (estável), libertando-se posteriormente uma molécula de água pelo facto do carbonilo ser mais estável que o hidrato.

De seguida, ocorre o ataque nucleofílico do carbono *orto* da anilina ao carbonilo da posição 2 do anel de dihidroquinolona, formando-se um anel de cinco membros que repõe a aromaticidade da estrutura. A desidratação do anel recém-formado conduz à posterior formação do indol (Esquema 6).⁽⁷³⁾



Esquema 6. Mecanismo proposto para a dupla ciclização dos ácidos 2-(2-(fenilamino)-acetamido)benzóicos (**69**, **70**) a quindolonas (**1**, **2**).

Os compostos **1** e **2** foram igualmente caracterizados pelas técnicas ¹H-RMN e COSY (Anexo V e Anexo VI) e p.f.. Os resultados espectroscópicos (Tabela 2 e secção 5.4.3.) obtidos para **1** e **2** encontram-se de acordo com a estrutura química dos compostos e a literatura.^(65, 66, 73) Em relação ao p.f., ambos os compostos apresentaram um p.f. superior a 300 °C, sendo corroborado pelos valores descritos na literatura.^(65, 66, 73)

Os prótons dos azotos indólicos e quinolínicos dos compostos **1** e **2**, sinal **H5** e **H10**, surgem como singletos a 12,47 ppm e 11,72 ppm (para o composto **1** e por esta

ordem) e a 12,64 ppm e 12,02 ppm (para o composto **2**). Esta atribuição está de acordo com a apresentada por Lavrado *et al* (2010)⁽⁷²⁾, onde é visível o efeito de NOESY entre o azoto indólico e o sinal do próton **H9** e entre o azoto quinolínico e os prótons **H4** e **H6**.

No espectro de ¹H-RMN do composto **1**, entre os 7,21 ppm e 8,37 ppm, surgem oito sinais correspondentes aos oito prótons aromáticos; já para o composto **2** aparecem seis sinais correspondentes aos prótons aromáticos entre os 7,30 ppm e 8,33 ppm.

No espectro de ¹H-RMN do composto **1** evidenciam-se quatro dupletos com acoplamento em *orto*, nomeadamente o sinal do próton **H1** a 8,37 ppm com o **H2** a 7,68 ppm ($J = 8,2$ Hz); o sinal a 7,43 ppm, **H9**, com o próton a 7,47 ppm (**H8**, $J = 8,3$ Hz); o sinal do próton **H6** a 8,20 ppm com **H7** a 7,21 ppm em *orto* ($J = 8,2$ Hz) e **H4** a 7,74 ppm com **H3** a 7,68 ppm, de $J = 8,5$ Hz. Estes acoplamentos estão corroborados pela a informação no espectro de COSY, onde são visíveis os sinais de correlação entre os prótons **H1** e **H2**, **H3** e **H4**, **H6** e **H7**, **H8** e **H9**.

O sinal a 7,68 ppm, **H3**, corresponde a um duplo duplete acoplado em *orto* com **H2** e **H4** ($J = 8,5$, 7,6 Hz). O sinal a 7,47 ppm, **H8**, possui também acoplamento com **H7** e **H9** em *orto* ($J = 8,3$, 7,5 Hz). O mesmo tipo de acoplamento é evidenciado pelo sinal correspondente **H2** a 7,29 ppm, acoplado com **H1** e **H3** ($J = 8,2$, 7,6 Hz) e o sinal a 7,21 ppm, **H7**, acoplado com **H6** e **H8** ($J = 8,2$, 7,5 Hz). No espectro de COSY surgem três sinais de correlação para cada conjunto destes prótons, representando cada um o sistema de prótons correlacionados entre si.

No espectro de ¹H-RMN do composto **2**, o sinal a 8,33 ppm, **H1**, e o sinal a 7,53 ppm, **H9**, apresentam o mesmo padrão de acoplamento verificado para o composto **1**. Já o sinal correspondente ao próton **H6** a 8,22 ppm, possui acoplamento com **H8** em *meta* ($J = 1,3$ Hz), à semelhança do verificado entre o **H4** a 7,70 ppm e **H2** ($J = 1,6$ Hz). A 7,48 ppm aparece um duplo duplete (**H8**) acoplado em *orto* com **H9** e em *meta* com **H6** ($J = 8,8$, 1,3 Hz). O sinal correspondente ao **H2**, um duplo duplete, possui também acoplamento em *orto* com o **H1** e acoplamento em *meta* com o **H4** ($J = 8,7$, 1,6 Hz, respectivamente).

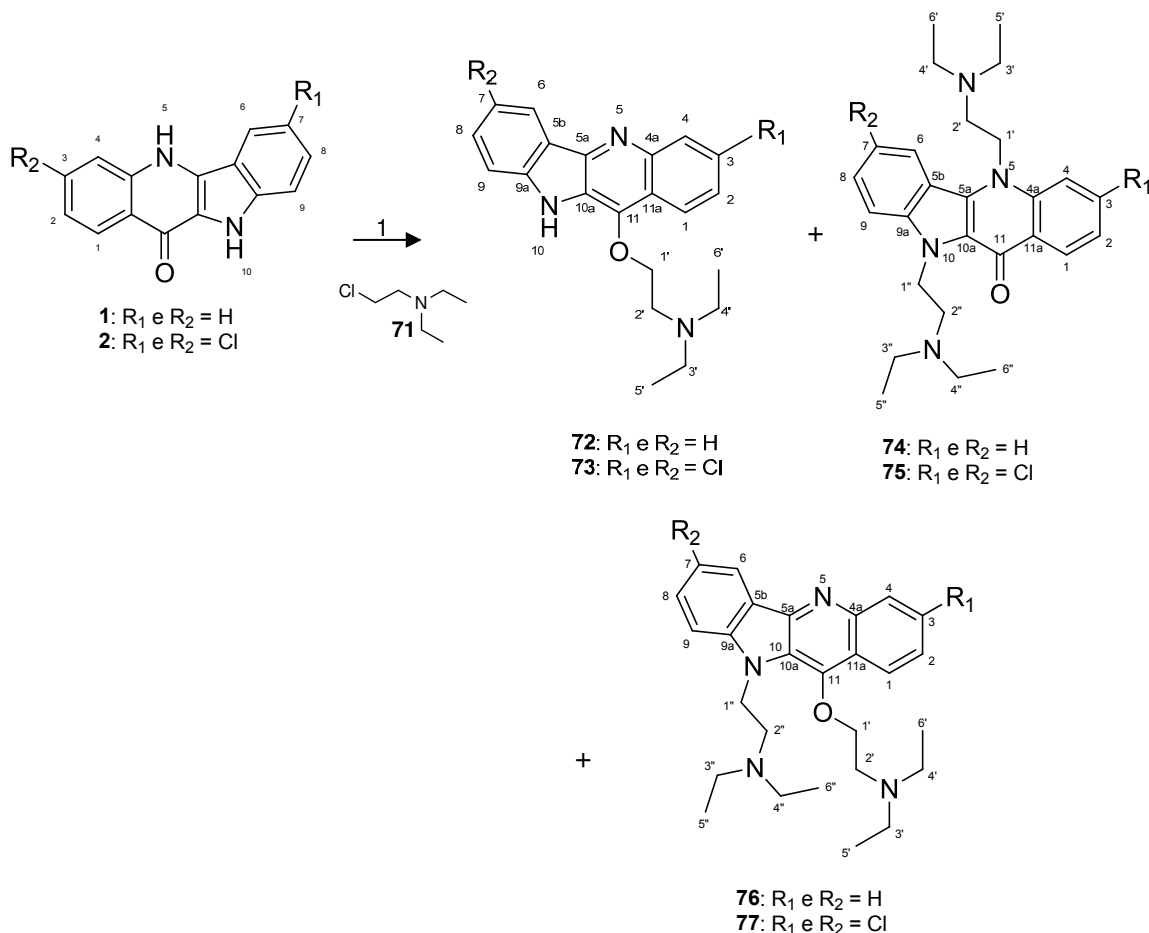
Tabela 2. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN para os compostos **1** e

2

δ (ppm), multiplicidade, número de prótons		
Posição dos H	1	2
1	8,37 (d, 1H)	8,33 (d, 1H)
2	7,29 (dd, 1H)	7,30 (dd, 1H)
3	7,68 (dd, 1H)	
4	7,74 (d, 1H)	7,70 (d, 1H)
5	12,47 (s, 1H)	12,64 (s, 1H)
6	8,20 (d, 1H)	8,22 (d, 1H)
7	7,21 (dd, 1H)	
8	7,47 (dd, 1H)	7,48 (dd, 1H)
9	7,53 (d, 1H)	7,53 (d, 1H)
10	11,72 (s, 1H)	12,02 (s, 1H)

3.1.2. Alquilação de Quindolonas

Os derivados mono e bis-alquilamina de quindolonas foram obtidos através de reacções de substituição nucleofílica com excesso de 2-cloro-*N,N*-dietiletanamina (Esquema 7). As condições da síntese foram escolhidas por serem as que demonstraram melhores resultados em estudos anteriores.⁽¹⁴⁾



Esquema 7. Síntese dos derivados de quindolonas. 1. K_2CO_3 , NaI, acetona destilada, refluxo.

Ao reagir a quindolona (**1**) com 4 equivalentes de 2-cloro-*N,N*-dietiletanamina (**71**) na presença de uma base (K_2CO_3) e iodeto de sódio (NaI) em acetona, ocorre a alquilação dos grupos nucleófilos **N5**, **N10** ou **O11**, com libertação de um ião iodeto. Desta reacção obteve-se a 2-[(10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il)oxi]-*N,N*-dietiletanamina (**72**, $\eta = 12,3 \%$) e a 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**74**, $\eta = 10,7 \%$), não se conseguindo isolar a 2-(11-(2-(dietilamino)etoxi)-10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-10-il)-*N,N*-dietiletanamina (**76**), como em reacções idênticas efectuadas por Lavrado *et al* (2010).⁽¹⁴⁾

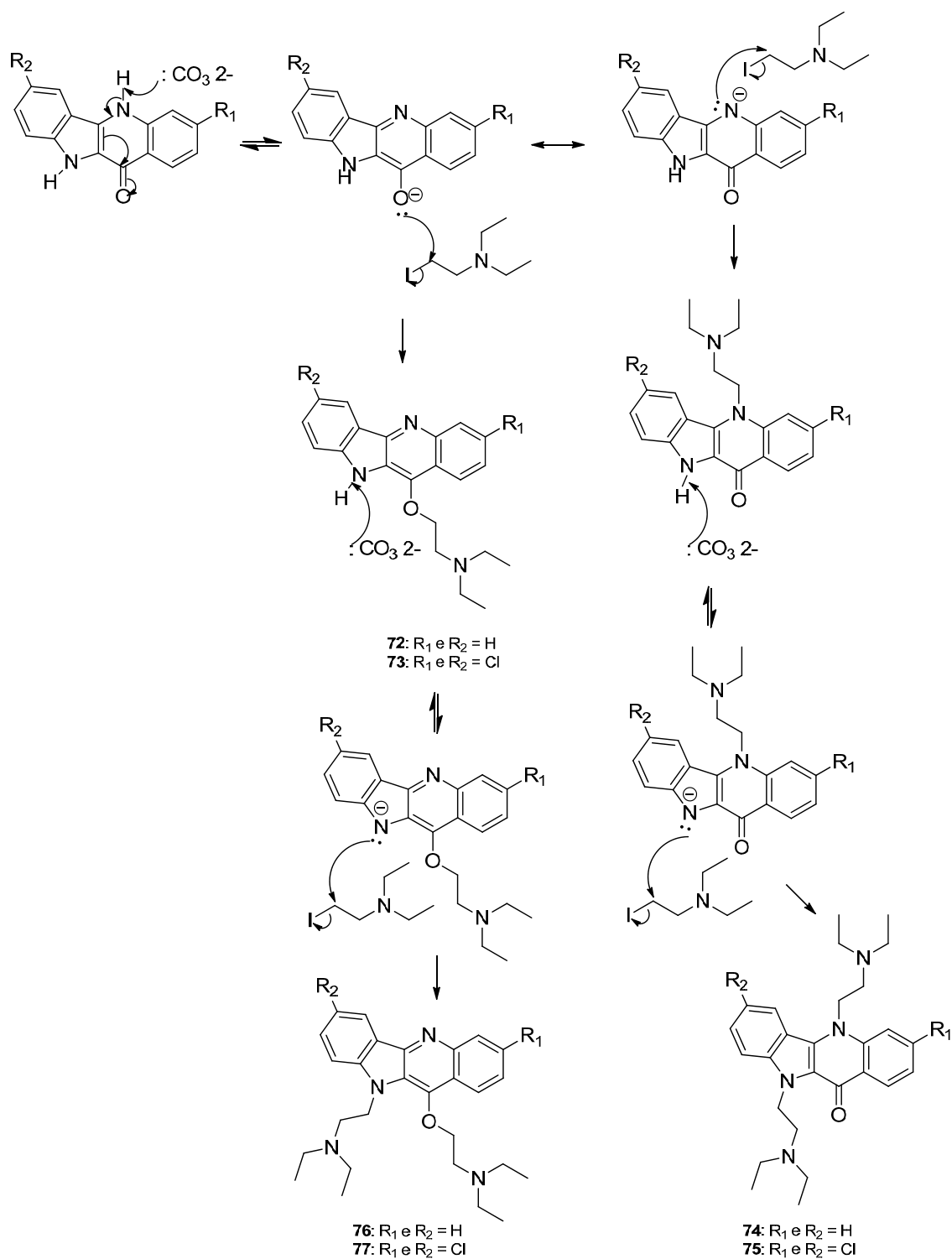
Os compostos **75** (3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona, $\eta = 7,6\%$) e **77** (2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il]oxi]-*N,N*-dietiletanamina, $\eta = 24,0\%$) foram obtidos após reacção do composto **2** com **71** e purificação por TLC preparativa. Nesta reacção não se verificou a formação do derivado **73**, que no estudo de Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾ apresentou um rendimento bastante baixo, estando de acordo com a afirmação que a introdução de cloro em **C3** e **C7** do núcleo de quindolona tende a promover a bis-alquilação, obtendo-se o produto bis-alquilado em **N10** e **O11** em maior quantidade do que em **N5** e **N10**.

Sugere-se que a formação dos derivados de quindolona se inicie com a desprotonação do azoto quinolínico pela base (K_2CO_3), ocorrendo ressonância tautomérica, surgindo duas estruturas de ressonância da quindolona (Esquema 8). Pensa-se que é o azoto quinolínico que desprotona por este ser mais ácido que o azoto indólico. Tal suposição advém da informação obtida pelo espectro de RMN 1H -RMN das quindolonas (**1** e **2**), em que o protão ligado ao azoto quinolínico **N5** possui um desvio químico maior que o protão ligado ao azoto indólico **N10**.

Na formação do derivado monoalquilado **72** ou **73**, a desprotonação do azoto quinolínico promove a activação do oxigénio carbonílico, que reage com o produto da substituição nucleofílica de **71** com NaI, formando o produto O-alquilado (Esquema 8).

Caso ocorra posterior desprotonação do azoto indólico pela base, ocorre activação do **N5** permitindo a reacção com outra cadeia dietilamina e dando origem ao produto *N*-O-bis-alquilado **76** ou **77** (Esquema 8).

Já na formação de **74** ou **75**, da desprotonação do azoto quinolínico pela base (K_2CO_3) resulta ressonância tautomérica que activa o **N5**, reagindo este com o produto da substituição nucleofílica de **71** com NaI **1** para formar o produto *N*₅-alquilado. Este produto é posteriormente desprotonado no azoto indólico pela base, ocorrendo nova alquilação em **N10**, formando o produto *N,N*-bisalquilado (Esquema 8).



Esquema 8. Mecanismo proposto para a síntese dos derivados mono e bis-alkilados de quindolona.

A caracterização dos derivados **72**, **74**, **75** e **77** foi estabelecida através das técnicas de 1H -RMN, ^{13}C -RMN (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono), COSY, HMQC e HMBC (espectroscopia de correlação heteronuclear a uma ligação e a longa distância,

respectivamente). Estas duas últimas técnicas foram essenciais na determinação dos desvios químicos de cada protão e carbono (Tabela 3, secção 5.4.4 e 5.4.5). Na confirmação da posição da cadeia em **N5** ou **N10** foi usada a técnica de NOESY (espectroscopia de efeito *overhouser* nuclear).

Procedeu-se ainda à caracterização por p.f. e análise elementar de C, N, H. Os p.f. determinados para os derivados de quindolona indicam que estes compostos se encontram puros, visto apresentarem intervalos de 2°C.

No espectro de ¹H-RMN do composto **72** (Tabela 3 e Anexo VII) verificaram-se oito sinais entre os 7,22 ppm e os 8,46 ppm, correspondentes aos oito protões aromáticos. Sob a forma de duplete com acoplamento *orto* surgem os sinais dos protões **H6**, **H4**, **H1** e **H9**, e como duplo duplete com acoplamento *orto* e *meta* tem-se o **H8**, **H3**, **H2** e **H7**, tal como descrito para o composto **1** (os respectivos desvios químicos apresentados na Tabela 3). O sinal correspondente ao **H10** surge com um desvio químico de 12,51 ppm sob a forma de um singuleto, cuja determinação da posição do hidrogénio foi possível pela análise da estrutura química do composto e por comparação com o estudo de Lavrado *et al*⁽⁷³⁾.

Os tripletos a 5,40 ppm e a 3,00 ppm ($J = 4,4$ Hz) integrando para dois protões cada sinal (**H1'** e **H2'**), e o aparecimento de correlações entre si no espectro bidimensional de COSY demonstra a ocorrência do produto monoalquilado. Os grupos etilo ligados ao azoto terminal são identificados por um quadripeto a 2,82 ppm ($J = 7,2$ Hz), que integra para quatro protões (**H3'** e **H4'**) e um tripleto correspondente a seis protões, a 1,18 ppm, os protões **H5'** e **H6'**, correlacionados entre si no espectro de COSY (Tabela 3).

No espectro de ¹³C RMN (Tabela 3 e Anexo VII) surgem os sinais correspondentes à introdução de uma cadeia alifática (**C1'** a **C6'**, 11,22 a 73,76 ppm), o desaparecimento do sinal a aproximadamente 170 ppm⁽⁷³⁾, correspondente ao carbono carbonílico da quindolona inicial e o aparecimento do sinal a 73,76 ppm (**C1'**) atribuível à função éter. Também se observa a mudança de desvio químico do **C11** para campos magnéticos mais altos, 144,60 ppm, o que é compatível com a nova função éter em **C11**, confirmando uma vez mais a alquilação no oxigénio.

A análise elementar obtida para **72** (C, 50,71%, H, 5,45% e N, 8,01%) mostrou estar em consonância com os resultados previamente calculados para a estrutura C₂₁H₂₃N₃O·4,6HCl (C, 50,33%, H, 5,55% e N, 8,38%).

Tabela 3. Desvios químicos e multiplicidade dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para os derivados de quindolonas

Posição	δ (ppm), multiplicidade, número de prótons							
	72		74		75		77	
	^1H -RMN	^{13}C -RMN	^1H -RMN	^{13}C -RMN	^1H -RMN	^{13}C -RMN	^1H -RMN	^{13}C -RMN
1	8,22 (d, 1H)	128,88	8,61 (d, 1H)	126,82	8,45 (d, 1H)	128,19	8,27 (d, 1H)	122,88
2	7,45 (dd, 1H)	124,28	7,28 (dd, 1H)	121,07	7,22 (dd, 1H)	122,17	7,41 (dd, 1H)	125,92
3	7,51 (dd, 1H)	129,45	7,64 (m, 2H)	131,48		140,52		132,70
4	8,25 (d, 1H)	120,96		114,20	7,64 (d, 1H)	114,54	8,17 (d, 1H)	128,08
4a		145,48		139,67		130,20		146,19
5								
5a		148,66		130,77		137,96		148,12
5b		122,48		115,18		123,02		123,34
6	8,46 (d, 1H)	122,20	8,18 (d, 1H)	122,63	8,17 (d, 1H)	121,75	8,35 (d, 1H)	121,73
7	7,22 (dd, 1H)	119,42	7,19 (m, 1H)	119,72		n.i.		125,66
8	7,57 (dd, 1H)	126,53	7,49 (dd, 1H)	127,58	7,46 (dd, 1H)	128,64	7,50 (dd, 1H)	129,95
9	7,38 (d, 1H)	111,11	7,58 (d, 1H)	110,73	7,73 (d, 1H)	112,49	7,36 (d, 1H)	110,55
9a		143,57		139,73		138,30		143,12
10	12,51 (s, 1H)							
10a		123,95		n.i.		126,04		125,29
11		144,60		169,11		168,65		145,05
11a		121,45		124,87		123,09		120,77
1'	4,50 (t, 2H)	73,76	4,79 (t, 2H)	47,36	4,64 (t, 2H)	47,79	4,19 (t, 2H)	74,99
2'	3,00 (t, 2H)	54,98	2,97 (t, 2H)	52,95	2,95 (t, 2H)	50,98	2,96 (t, 2H)	53,07
3'	2,82 (q, 2H)	48,52	2,68 (m, 2H)	47,70	2,64 (q, 2H)	47,93	2,61 (q, 2H)	47,65
4'	2,82 (q, 2H)	48,52	2,68 (m, 2H)	47,70	2,64 (q, 2H)	47,93	2,61 (q, 2H)	47,65
5'	1,18 (t, 3H)	11,22	1,04 (t, 3H)	11,86	1,03 (t, 3H)	11,92	1,03 (t, 3H)	11,80
6'	1,18 (t, 3H)	11,22	1,04 (t, 3H)	11,86	1,03 (t, 3H)	11,92	1,03 (t, 3H)	11,80
1''			4,98 (t, 2H)	42,65	5,05 (t, 2H)	41,35	4,60 (t, 2H)	43,59
2''			2,91 (t, 2H)	50,88	3,05 (t, 2H)	52,19	2,71 (t, 2H)	51,76
3''			2,68 (m, 2H)	47,50	2,84 (q, 2H)	47,05	2,51 (q, 2H)	47,53
4''			2,68 (m, 2H)	47,50	2,84 (q, 2H)	47,05	2,51 (q, 2H)	47,53
5''			1,04 (t, 3H)	11,86	1,15 (t, 3H)	29,72	0,87 (t, 3H)	11,80
6''			1,04 (t, 3H)	11,86	1,15 (t, 3H)	29,72	0,87 (t, 3H)	11,80

*n.i. não identificado

O composto **74** apresenta no espectro de ^1H -RMN um padrão de acoplamentos dos prótons aromáticos semelhante com o descrito para o **72**, com variações apenas nos desvios químicos, situando-se os oito sinais aromáticos entre os 7,19 ppm e os 8,61 ppm (Tabela 3 e Anexo VIII). O sinal a aproximadamente 12 ppm, próton **H10**, encontra-se ausente no espectro (à semelhança do **H5**), o que sugere a bis-alkilação da quindolona.

É de referir que o sinal a 7,64 ppm, surge como um multipeto devido à sobreposição dos sinais dos prótons **H3** e **H4**. Já o sinal a 7,19 ppm, **H7**, aparece como um multipeto por causa da sobreposição do mesmo com o sinal do próton do clorofórmio (Anexo VIII), sendo na realidade um duplo dupeto.

A introdução de duas cadeias alquilamina é visível através da identificação dos correspondentes tripletos a 4,98 ppm (**H1''**) e 2,91 ppm (**H2''**) com $J = 7,6$ Hz, bem como a 4,79 ppm (**H1'**) e 2,97 ppm (**H2'**) ($J = 8,0$ Hz), integrando cada sinal para dois prótons, correlacionados entre si no espectro bidimensional de COSY (Tabela 3). Os grupos etilo ligados ao azoto terminal são identificados pelos sinais a 2,68 ppm (**H3'**, **H4'**, **H3''** e **H4''**) e 1,04 ppm (**H5'**, **H6'**, **H5''** e **H6''**), que integram oito prótons e doze prótons, respectivamente. Como os desvios químicos para cada grupo etilo são semelhantes, os sinais surgem sobrepostos, não sendo possível identificar a multiplicidade e constantes de acoplamentos para **H3'**, **H4'**, **H3''** e **H4''**.

Como não foi possível a execução de um espectro de NOESY (devido à quantidade de massa disponível do composto), a determinação dos desvios químicos de cada cadeia em **N5** e **N10** foi efectuada por comparação com os dados obtidos por Lavrado *et al* (2010)⁽⁷³⁾ e com auxílio do espectro HMBC. No espectro de HMBC identifica-se a correlação do próton **H1''** a 4,98 ppm com o **C9a** a 139,73 ppm, confirmando a alquilação em **N10** e a correlação de **H1'** a 4,79 ppm com **C4a** a 139,67 ppm e com **C5a** a 130,77 ppm, corroborando a alquilação em **N5**.

No espectro de ^{13}C RMN surgem os sinais correspondentes à introdução de duas cadeias alquílicas (**C1'** a **C6'** e **C1''** a **C6''**, de 11,86 ppm a 52,95 ppm), sendo também visível o sinal com um valor de 169,1 ppm, correspondente ao carbono carbonílico da quindolona inicial a **C11**, indicando a não alquilação no oxigénio.

A análise elementar (C, H, N) calculada para a estrutura **74**, $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O} \cdot 7,5\text{HCl} \cdot 0,1\text{H}_2\text{O}$, C = 45,81%, H = 6,22% e N = 7,91%, está de acordo com os resultados obtidos para C (46,18%) e H (6,23%). Para o átomo de azoto (7,38%) a diferença é de 0,53%, o que pode indicar que o composto não se encontra totalmente puro.

No espectro de ^1H RMN do composto **75** (Tabela 3 e Anexo IX) surgem seis sinais entre 7,22 ppm e 8,45 ppm, correspondendo a seis prótons aromáticos. A multiplicidade dos prótons aromáticos é similar à apresentada para **2**, em que surgem dupletos correspondentes a **H1** e **H9** com acoplamento *orto*. Já os sinais correspondentes aos prótons **H6** e **H4** aparecem sob a forma de dupletos com acoplamento em *meta*. Como duplo duplete com acoplamento *orto* e *meta* são identificáveis os sinais dos prótons **H8** e **H2**.

A bis-alquilação é identificada através da presença de quatro tripletos, integrando cada um para dois prótons alifáticos: uma cadeia com sinais a 5,05 ppm (**H1''**) e 3,05 (**H2''**), com $J = 7,4$ Hz; e outra com sinais a 4,64 ppm (**H1'**) e 2,95 ppm (**H2'**), de $J = 7,5$ Hz, sendo a correlação identificada pela análise do espectro de COSY. O aparecimento de

dois quadriplos (a 2,84 ppm e 2,64 ppm - **H3''**, **H4''** e **H3'**, **H4'**, respectivamente), integrando cada um para quatro prótons e de dois tripletos (a 1,15 ppm e 1,03 ppm - **H5''**, **H6''** e **H5'**, **H6'**, por esta ordem e com $J = 7,1$ Hz), correspondendo a seis prótons cada, com correlação entre si no espectro de COSY, corrobora a presença de duas cadeias *N-N*-dietiletanamina na molécula.

No espectro de NOESY (Figura 25) é visível a correlação entre o tripleto a 5,05 ppm que integra para dois prótons (**H1''**) e o próton aromático **H9** a 7,73 ppm, o que demonstra a alquilação no **N10**. Já o mesmo tipo de correlação entre os dois prótons a 4,64 ppm (**H1'**) e **H6** e **H4** (a 8,17 ppm e 7,64 ppm, respectivamente) revela a alquilação em **N5**.

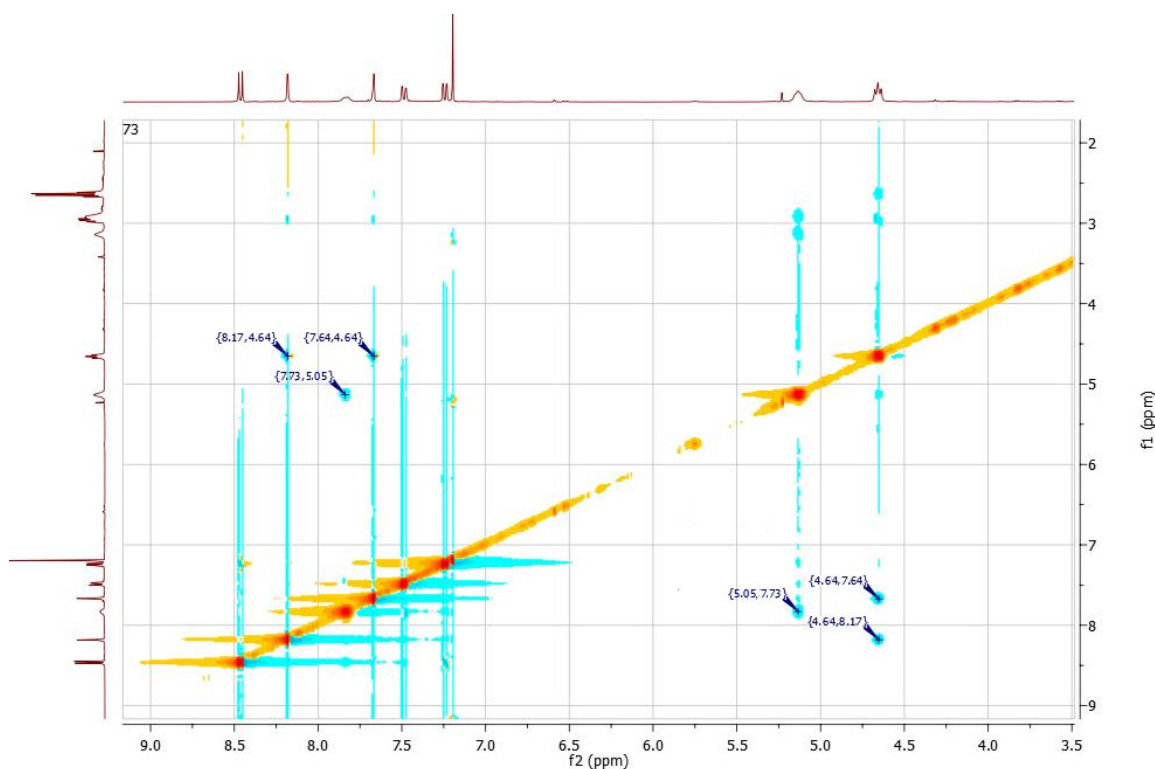


Figura 25. Espectro de NOESY do composto **75**.

O espectro de ^{13}C RMN (Anexo IX) corrobora a introdução de duas cadeias alquilamina, nomeadamente através dos sinais entre os 11,82 ppm e 52,19 ppm (**C1'** a **C6'** e **C1''** a **C6''**) e a não alquilação do oxigénio através da identificação do sinal do carbono carbonílico a 168,65 ppm.

Os resultados da análise elementar para o composto **75** (C, 43,08%, H, 5,38% e N, 7,42%) encontram-se uma vez mais de acordo com os calculados para a estrutura $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O} \cdot 6,9\text{HCl}$ (C = 43,06%, H = 5,47% e N = 7,44%).

No espectro de ^1H RMN do composto **77** (Tabela 3 e Anexo X), os sinais e acoplamentos dos prótons aromáticos são iguais aos descritos para o **75**, apenas com ligeiras modificações nos desvios químicos. É notória a presença de duas cadeias alquilaminas, com o mesmo padrão de sinais e acoplamento que no espectro ^1H -RMN do **75**, mas com desvios químicos ligeiramente diferentes.

O espectro de NOESY mostra a correlação entre o tripleto a 4,19 ppm, **H1'**, que integra para dois prótons e o próton aromático **H1** a 8,27 ppm, indicando que a alquilação ocorreu no oxigênio. É igualmente visível a correlação entre o sinal a 2,71 ppm (integrando a dois prótons, **H2''**) ou o sinal a 4,60 ppm (**H1''**, integrando a dois prótons), com o próton aromático **H9** a 7,36 ppm, o que demonstra a alquilação em **N10** e não no **N5**.

No espectro de ^{13}C RMN surgem os sinais correspondentes à introdução de duas cadeias dietiletanamina, entre os 11,80 ppm e os 74,99 ppm, do **C1'** a **C6'** e do **C1''** a **C6''**; o desaparecimento do sinal do carbono carbonílico da quindolona inicial a aproximadamente 170 ppm e a sua substituição pelo sinal a 74,99 ppm, que indica o aparecimento de um carbono alquílico de uma função éter, **C1'**, e um sinal de $\text{Csp}^2\text{-O}$ a 145,05 ppm (**C11**), corrobora a alquilação no oxigênio. No espectro HMBC é igualmente visível a correlação do sinal tripleto do próton **H1'** a 4,19 ppm com o carbono a 145,05 ppm, **C11**, o que confirma uma vez mais a alquilação no oxigênio. Também pelo espectro de HMBC se identifica a correlação do próton **H1''** a 4,60 ppm com o **C9a** a 143,13 ppm e com **C10a** a 125,29 ppm, corroborando a alquilação em **N10**.

Os resultados obtidos através da análise elementar do composto **77** (C = 47,09%, H = 5,83 % e N, 8,12%) estão em concordância com os previamente calculados para a estrutura $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}\cdot 5\text{HCl}\cdot 0,2\text{H}_2\text{O}$ (C = 47,18 %, H = 5,78% e N = 8,15%).

3.2. Aplicação da Técnica de Microondas à Reacção de Ciclização Catalisada por Ácido Polifosfórico na Síntese de Quindolonas

A utilização da técnica por microondas tem a vantagem de reduzir o tempo das reacções. Está descrito que o aquecimento por microondas tende a reduzir as reacções paralelas, aumentar o rendimento e permite o controlo da temperatura e pressão.⁽⁷⁷⁾

Neste estudo efectuou-se o estudo da ciclização do composto **69** com PPA utilizando a técnica de microondas, de forma a estudar as possíveis vantagens da aplicação desta técnica, nas variáveis rendimento, grau de pureza e tempo de reacção.

Inicialmente manteve-se a potência a 200 W e variou-se o tempo da reacção (A-D) entre 10 e 30 minutos, posteriormente variou-se a potência entre 50 W e 300 W, mantendo-se o tempo constante. A temperatura (130 °C) e a pressão (atmosférica) não sofreram alteração (Tabela 4).

Foi igualmente efectuada a mesma reacção sem a técnica de microondas partindo da massa inicial de 250 mg, fazendo variar entre uma hora e duas horas de reacção (**1I** e **1J**) (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da variação das condições na síntese da quindolona **1**

Composto	Potência (W)	Tempo (minutos)
1A	200	10
1B	200	15
1C	200	20
1D	200	30
1E	50	15
1F	100	15
1G	150	15
1H	300	15
1I	(não aplicável)	60
1J	(não aplicável)	120

O restante procedimento foi idêntico ao descrito para o composto **1** (secção 5.4.3.1.). Após purificação de 20,0 mg de cada produto reaccional por TLC preparativa, isolou-se o composto.

A partir da análise dos rendimentos finais (que constitui na multiplicação do rendimento bruto com o rendimento da purificação por TLC preparativa) da síntese de (**1**) pelo método de microondas (A-D), concluiu-se que os 15 minutos de reacção foram os que possibilitaram a formação de mais composto (**1B**, 51,4%). Verificou-se também

que a potência ideal (A-H) foi entre os 100-200 W (**1B**, 51,4% e **1F**, 51,1%). Estes valores de rendimento foram bem próximos dos obtidos através do método convencional (**1J**), a 130°C com duas horas de reacção (Tabela 5).

Em relação ao método convencional verificou-se que uma hora de reacção (**1I**) conduziu a um rendimento final inferior; e apesar do rendimento bruto de **1I** ser superior a todos os restantes, rapidamente se depreendeu após purificação por TLC em preparativa, que a percentagem de quindolona era estritamente inferior (apenas 60,5%).

Tabela 5. Massas e rendimentos obtidos da quindolona **1A-J**

	Massa Inicial (69)	Massa 1 (A-J)	Rendimento bruto	Massa aplicada (Preparativa)	Massa obtida após purificação 1 (A-J)	Rendimento da purificação 1 (A-J)	Rendimento final
1A	250,6 mg	87,6 mg	40,3 %	20,0 mg	17,4 mg	87,0 %	35,1 %
1B	250,0 mg	121,8 mg	56,2 %	20,1 mg	18,3 mg	91,5 %	51,4 %
1C	250,3 mg	101,5 mg	46,8 %	20,0 mg	18,1 mg	90,5 %	42,4 %
1D	250,1 mg	101,8 mg	47,0 %	20,1 mg	17,3 mg	86,1 %	40,5 %
1E	250,3 mg	125,3 mg	57,8 %	20,0 mg	13,9mg	69,5 %	40,2 %
1F	250,1 mg	114,7 mg	52,9 %	19,9 mg	19,2 mg	96,5 %	51,1 %
1G	249,9 mg	104,2 mg	48,1 %	20,2 mg	16,5 mg	81,7 %	39,3 %
1H	250,6 mg	97,8 mg	45,0 %	20,1 mg	16,8 mg	83,6 %	37,6 %
1I	250,0 mg	163,4 mg	56,6 %	20,0 mg	12,1 mg	60,5 %	34,2%
1J	250,0 mg	158,2 mg	54,6%	20,2 mg	18,4 mg	91,1 %	49,7 %

De uma forma geral é visível que os valores de rendimento obtidos através do método por microondas (**1B** e **1F**) são similares aos do método convencional (durante duas horas, **1J**), sendo a redução do tempo a maior vantagem da técnica por microondas.

Através do TLC comparativo entre os produtos reaccionais das sínteses **1A-H** (Figura 26) verificou-se a presença de uma elevada quantidade de composto **69** para **1E** e **1A**, em consonância com o facto de a conversão destas quindolonas ter sido inferior.

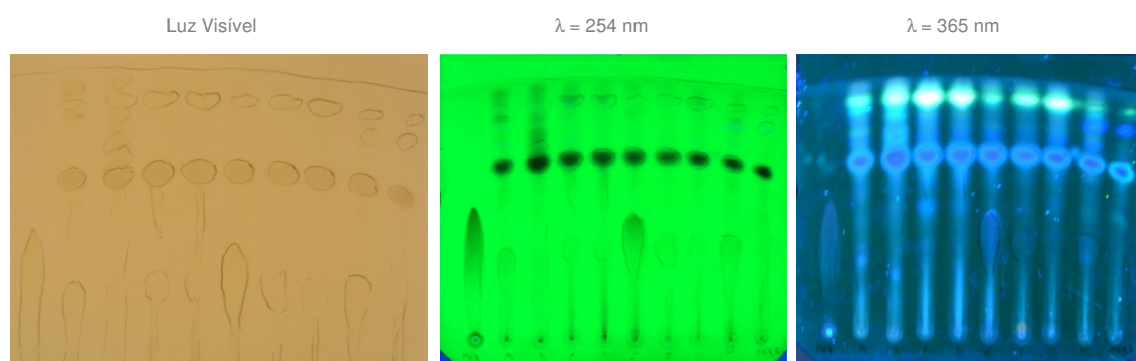


Figura 26. TLC comparativo entre o composto **69** (em primeiro lugar), produtos obtidos na técnica de microondas (pela ordem de A-H) e a quindolona **1 J**.

Foi efectuado o ^1H -RMN dos produtos reaccionais obtidos antes de purificação e das quindolonas puras (Anexos XI-XX), na tentativa de identificar o tipo de impurezas, nomeadamente a presença do precursor **69**.

A partir do espectro de ^1H -RMN do composto **1E** impuro foi possível determinar três sinais característicos do seu antecessor **69** (a aproximadamente a 12 ppm da amina, 8,75 ppm de um protão aromático e a 3,84 ppm dos protões alifáticos), sinais esses utilizados para determinar a quantidade relativa do composto **69** na mistura reaccional (Figura 27). Os espectros que mostraram uma maior proporção de impurezas foram o do composto **1E** com 0,35, seguido do **1A** e **1H**, com 0,14 do seu precursor **69** (Tabela 6).

Assim, inferiu-se que o espectro do composto **1A**, com reacção de 10 minutos, apresentava-se com sinais possivelmente do seu precursor, uma vez que não ocorreu o tempo necessário de reacção. Já para **1E**, a potência de 50 W não foi suficiente na conversão do composto. A 300 W (**1H**) não seria a condição ideal uma vez que o espectro possuía impurezas da mesma ordem de grandeza que o **1A**.

É de realçar que nas quindolonas **1A**, **1C**, **1D**, **1G** e **1H**, são visível sinais no espectro de ^1H -RMN que integravam para mais moléculas que não a quindolona (**1**) e o **69** (como é visível na zona dos aromáticos dos respectivos espectros), podendo ser produtos secundários da reacção ou produtos da ciclização incompleta da quindolona. Pensou-se que esses sinais poderiam ser do composto **65**, contudo ao analisar o espectro de ^1H -RMN de **69** (Anexo III), verifica-se que as impurezas presentes não pertencem a este, por não existir nenhum sinal a aproximadamente 4,26 ppm, característicos dos protões alifáticos de **65**.

Outro facto a realçar é o espectro do composto **1I** impuro possuir apenas 0,04 de impurezas e o rendimento após purificação ser sido apenas 60,5%. Isto poderá dever-se ao facto de a síntese após reacção de uma hora, segundo o método convencional, originar impurezas que não são solúveis, logo não aparecerem no espectro ^1H -RMN. De uma forma geral existe correlação entre os rendimentos de isolamento de todas as quindolonas com a proporção de **69** no produto de síntese não purificado.

Curiosamente a síntese de **1G**, a 150 W e 15 minutos, apresenta apenas 0,02 do composto **69**, o que vai de encontro das condições ditas ideais nesta síntese (ao analisar os rendimentos de todas as quindolonas). O facto de após purificação apenas 81,7% corresponder à quindolona reforça o facto de outras impurezas estarem envolvidas apesar de não serem visíveis no espectro (nessa proporção).

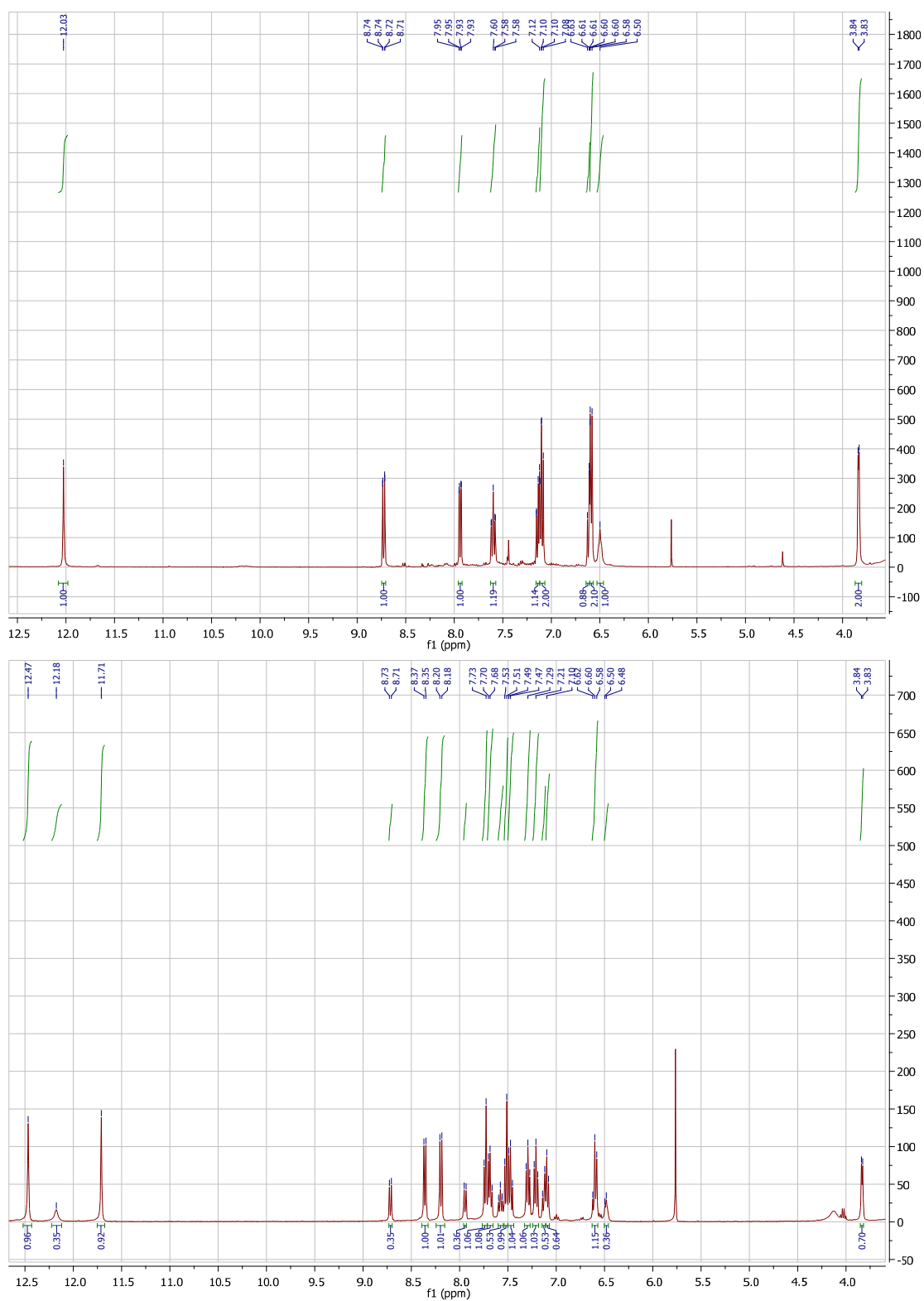


Figura 27. Espectro de ^1H -RMN do composto **69** e **1E** impuro.

Tabela 6. Integração relativa dos sinais característicos do precursor **69** nos espectros de ^1H -RMN das quindolonas **1A-J**

	NH ($\delta \approx 12,0$ ppm)	Aromáticos ($\delta \approx 8,75$ ppm)	CH ₂ ($\delta \approx 3,84$ ppm)
1A	0.13	0.14	0.28
1B	0.06	0.08	0.16
1C	0.04	0.04	0.08
1D	0.03	0.04	0.08
1E	0.35	0.35	0.70
1F	n.i.	0.07	0.14
1G	0.02	0.02	0.04
1H	0.12	0.14	0.28
1I	0.01	0.04	0.08
1J	n.i.	n.i.	n.i.

*n.i. não identificado

Analisando os dados obtidos por este estudo, sugere-se que os baixos rendimentos da síntese de **1** por ciclização com PPA estão associados à quantidade de composto precursor, **69**, que não cicliza quando o tempo de reacção ou a potência não são suficientes, no caso da técnica por microondas. No método convencional, uma hora parece ser suficiente para que se consuma praticamente todo o composto **69**.

O facto da ciclização não ser completa, pode conduzir a produtos secundários. Como nesta síntese o meio é ácido e ocorre libertação de água, pode formar-se produtos resultantes da hidrólise do composto **69**. Outros factores, como a eficácia da extracção de **1**, podem estar associados aos baixos rendimentos da síntese de **1**.

3.3. Actividade Antimalárica e de Quimiosensibilização dos Derivados de Quindolonas

3.3.1. Actividade Antimalárica *in vitro*

A actividade antimalárica (IC_{50}) dos derivados da quindolona foi estabelecida através de ensaios *in vitro* em eritrócitos humanos infectados com 1% de *P. falciparum* em dois clones: 3D7 (sensível à CQ e MQ, Rosário, 1981) e Dd2 (resistente à CQ e MQ, Oduola *et al*, 1988). O IC_{50} dos compostos foi determinado através da técnica de microteste, sendo cada ensaio efectuado em triplicado e de forma independente. Como padrão foi usado a CQ e a MQ (Tabela 7).

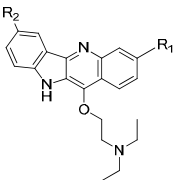
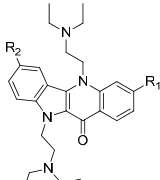
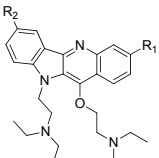
Os valores de IC_{50} obtidos para a CQ foram de 18,3 nM no clone de *P. falciparum* 3D7 e 179,7 nM para o clone resistente Dd2. Estes valores estão de acordo com os obtidos por Ramalhete *et al* (2010)⁽⁷⁸⁾, cujo IC_{50} foi obtido pela técnica de fluorescência SYBR-Green I, no IHMT, obtendo os valores de 16 nM e 200 nM, para clones 3D7 e Dd2, respectivamente. Já Madureira *et al* (2002)⁽⁷⁹⁾ determinou o IC_{50} da CQ em clones resistentes de *P. falciparum* Dd2, com a técnica de microteste no IHMT, obtendo um IC_{50} igual a 182 nM, igualmente próximo de 179,7 nM.

Para a MQ, o IC_{50} no clone de *P. falciparum* 3D7 foi de 51,3 nM e para o clone resistente Dd2 de 147,5 nM. Estes valores são corroborados pelos obtidos por Nogueira *et al* 2008⁽⁸⁰⁾, no IHMT, cujo IC_{50} para clones 3D7 é de 43 nM e para clones Dd2 de 200 nM.

Ao verificar os IC_{50} dos derivados da quindolona apresentados na tabela 7 é visível que o composto **77** possui a actividade antimalárica mais alta, quer em clones sensíveis 3D7 (147,6 nM) quer em resistentes Dd2 (227,1 nM). De facto, o seu IC_{50} para clones resistentes de *P. falciparum* Dd2 é bastante próximo ao apresentado para a CQ no mesmo clone (179,7 nM). Estes resultados vão ao encontro dos apresentados por Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾, em que o mesmo composto demonstrou ser o mais activo dos testados para o clone resistente W2, com IC_{50} de 51 nM.

Já o composto com menor actividade antimalárica no presente estudo foi o monoalquilado, **72**, com um IC_{50} de 4869 nM em clones sensíveis de *P. falciparum* 3D7 e superior a 10 μ M, em clones Dd2 (Tabela 7).

Tabela 7. Actividade antimalárica *in vitro* da CQ, MQ e derivados da quindolona em clones de *P. falciparum* sensíveis (3D7) e resistentes (Dd2)

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;">  <p>72: R₁ e R₂ = H</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>74: R₁, R₂ = H 75: R₁, R₂ = Cl</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>76: R₁, R₂ = H 77: R₁, R₂ = Cl</p> </div> </div>					
Composto	IC ₅₀ nM (3D7)*	R ²	IC ₅₀ nM (Dd2)*	R ²	IR**
CQ	18,3 ± 5,3	0,9776	179,7 ± 6,2	0,9710	9,8
MQ	51,3 ± 7,7	0,9563	147,5 ± 13,2	0,9091	2,9
72	4869 ± 9,8	0,8610	>10000	-	-
74	2659 ± 12,4	0,8023	6684 ± 10,0	0,8905	2,5
75	1533 ± 8,3	0,9236	2006 ± 7,9	0,9310	1,3
76	169,0 ± 11,5	0,8720	5331 ± 7,5	0,9350	13,8
77	147,6 ± 12	0,8778	227,1 ± 5,7	0,9737	1,5

* Valores obtidos de três ensaios independentes e leituras de dois operadores (Anexo XXII, curvas de concentração-resposta)

** Índice de resistência (IR) = IC₅₀ Dd2 / IC₅₀ 3D7

Pensa-se que a introdução de uma cadeia alquilamina é importante na actividade antimalárica, visto que quindolonas não substituídas mostraram ser inactivas em clones resistentes W2 (com IC₅₀ > 10 µM, para **67** e **68**) e derivados monoalquilados fracamente activos (**72**) com IC₅₀ 2638 ± 22 nM em clones resistentes de *P. falciparum* W2.⁽¹⁴⁾ Sugere-se que o aumento da actividade se deva à acumulação do composto dentro do VD e à sua ligação à hemozoína devido ao grupo da amina terciária da cadeia lateral alquílica.⁽¹⁴⁾ Contudo não se verificou esta situação no presente estudo, uma vez que, em clones resistentes Dd2, o composto monoalquilado **72** sintetizado foi igualmente inactivo (IC₅₀ > 10 µM).

Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾ verificou também que os compostos com cadeias bis-alquilamina apresentavam actividade antimalárica elevada, com valores de IC₅₀ entre os 51-539 nM em clones resistentes W2.⁽¹⁴⁾ De facto, perante a análise dos IC₅₀ dos compostos sintetizados é visível que a presença de duas cadeias alquilamina ligadas ao núcleo de quindolona aumenta a actividade antimalárica do composto (comparando por exemplo o composto **72** com **76**), em ambos os clones. Assim, enquanto que o composto monoalquilado (**72**) possui um IC₅₀ na ordem dos milhares em clones sensíveis 3D7 (4869 nM) o composto *N,O*-bis-alquilado (**76**) apresenta um IC₅₀ na ordem das centenas (169,0 nM); já para o clone Dd2, o composto **72** tem um IC₅₀ superior a 10000 nM e o **76** na ordem dos milhares (5331 nM).

Relativamente à introdução de cloros no núcleo da quindolona (**C3** e **C7**), detectou-se um aumento muito ligeiro da actividade antimalárica para os compostos *N,N*-bis-

alquilamina em ambos os clones (3D7, **74** com $IC_{50} = 2659$ nM e **75** com $IC_{50} = 1533$ nM; Dd2, **74** com $IC_{50} = 6684$ nM e **75** com $IC_{50} = 2006$ nM). No caso dos compostos *N,O*-bis-alquilados, a substituição por cloros aumentou significativamente a actividade antimalária, visto que no composto sem cloros (**76**) o IC_{50} foi de 169,0 nM para o clone sensível e 5331 nM para o clone resistente, e para o composto com cloros (**77**), o mais activo, obteve-se um valor de IC_{50} de 147,6 nM em clones 3D7 e 227,1 nM para Dd2.

Lavrado *et al* (2010) verificou também que a substituição por cloros (em **C3** e **C7**), aumentava significativamente a actividade antiplasmódica no caso dos derivados *N,O*-bis-alquilamina e que a di-halogenação de *N,N*-derivados de quindolona não alterava significativamente a actividade antimalária.⁽¹⁴⁾

O Índice de Resistência (IR) é uma medida da actividade antimalária de um composto entre clones resistentes e clones sensíveis, indicando a capacidade que o mesmo possui de ultrapassar o fenómeno de resistência. A fórmula de cálculo do IR corresponde a divisão do IC_{50} do composto em clones resistentes sobre o IC_{50} em clones sensíveis.

O composto **76** foi o que apresentou o valor de IR mais alto, 13,8, superior ao da CQ (9,8). Este valor sugere que o composto está muito mais propenso ao fenómeno de resistência, que qualquer um dos outros. Já os restantes compostos, **74**, **75** e **77** possuíam um IR baixo, inferior ao da mefloquina. Curiosamente, os compostos **75** e **77** apresentavam, respectivamente, valores de IR de 1,3 e 1,5, indicando a alta capacidade de os mesmos superarem o fenómeno de resistência (Tabela 7).

Estes resultados sugerem que di-halogenação em derivados de quindolonas pode conduzir a compostos com uma capacidade superior de superar a resistência.

3.3.2. Actividade Quimiosensibilizadora

Ao verificar que **77** apresentava uma actividade antimalária mais elevada, foi avaliada a capacidade quimiosensibilizadora do composto em clones resistentes Dd2. Para isso fixou-se uma concentração subinibitória de **77** (100 nM) e combinou-se esta concentração com uma série de sete diluições de 1:2 de CQ (concentração inicial de 640 nM) e MQ (concentração inicial de 1280 nM).

O efeito quimiosensibilizador foi determinado ao comparar as curvas de concentração-resposta da CQ, da MQ e da combinação de cada um dos fármacos com **77** a 100nM (Figura 28).

Ao visualizar a curva de concentração-resposta da CQ e da curva da CQ + **77**, facilmente se depreende que a combinação de ambos os fármacos conduz a uma maior inibição do crescimento de parasitas a concentrações mais baixas de CQ, em comparação com apenas a CQ. O mesmo é visível para a MQ, apesar de não ser tão marcante o deslocamento da curva correspondente à combinação de fármacos.

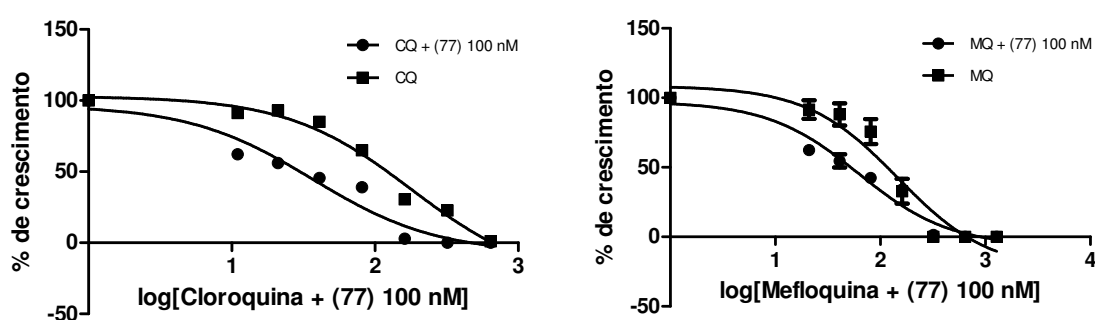


Figura 28. Curvas de concentração-resposta da CQ, MQ, CQ + **77** e MQ + **77**.

Através dos dados obtidos das curvas de concentração-resposta foi possível calcular o Índice de Modificação de Resposta (IMR). O IMR consiste na divisão entre o IC_{50} de um fármaco A + fármaco B e o IC_{50} do fármaco A. Neste caso o fármaco A correspondia à CQ ou MQ, e o fármaco B ao composto **77**. Um valor de IMR igual a 1 mostra que não ocorreu alteração ao combinar ambos os fármacos; já um IMR inferior a 1 indica que a molécula é quimiosensibilizadora e se for superior a 1 mostra o antagonismo entre ambos os compostos.⁽⁵⁸⁾

O IMR obtido para a combinação de CQ + **77** (100nM) foi de 0,205 e para MQ + **77** (100nM) foi de 0,432, o que nos indica que o composto **77** é quimiosensibilizador em clones Dd2, para a CQ e MQ (Tabela 8).

Tabela 8. IC_{50} da CQ, MQ e da combinação com o composto **77** em clones resistentes Dd2

Composto	IC_{50} nM (Dd2)	R^2	IMR*
CQ	$179,7 \pm 6,2$	0,9710	0,205
CQ + 77 (100 nM)	$36,84 \pm 8,2$	0,9432	
MQ	$147,5 \pm 13,2$	0,9091	0,432
MQ + 77 (100 nM)	$63,72 \pm 7,4$	0,9534	

* Índice de Modificação de Resposta (IMR) = $IC_{50}(X + 77) / IC_{50}(X)$ (X = CQ ou MQ)

Kelly *et al* (2007)⁽⁵⁸⁾, como já referido, desenhou 10-*N*-acridonas (**41**), compostos estruturalmente relacionados com as quindolonas, variando a cadeia alquilo entre o azoto do núcleo da acridona e o azoto da amina da cadeia terminal. O composto cuja cadeia alquilada tinha dois carbonos ($n = 2$), como a cadeia alquílica encontrada nos derivados de quindolonas, demonstrou ser pouco activo em clones de *P. falciparum* Dd2 (7500 nM) e ao apresentar um valor de IMR de 1,06 (quando se adicionou CQ a 500 nM ao mesmo composto) evidenciou não ser quimiosensibilizador. Já o derivado com 6 carbonos na cadeia alquilamina, apresentou uma actividade antimalárica moderada, 2700 nM, equivalente à apresentada para o verapamil (2000 nM), mas o seu IMR foi o mais promissor, com valor de 0,18 (enquanto que o do verapamil era de 0,53). De uma forma geral, todos os compostos com cadeia alquilamina com 3 ou mais carbonos, apresentaram ser quimiosensibilizadores para a CQ, quinina e desetilcloroquina. Esse efeito foi semelhante com o apresentado pelo verapamil, em clones mutados no aminoácido 76, para a CQ e quinina.⁽⁵⁸⁾

Já em 2009, Kelly e seus colaboradores⁽¹³⁾, sintetizaram derivados da acridona (**42**), com carácter bifuncional, ou seja, alta actividade antimalárica e quimiosensibilizadores a fármacos antimaláricos quinolínicos em clones *P. falciparum* Dd2. O composto com cadeias etilamina (n e $m = 2$) foi o que apresentou actividade antimalárica mais elevada, em clones sensíveis à CQ de *P. falciparum* (D6), com IC_{50} de 44,8 nM e em clones resistente Dd2 um IC_{50} de 77,3 nM. Este composto tem semelhanças com o composto **77**, nomeadamente o tipo, tamanho e posição das cadeias; sendo a actividade antimalárica também bastante próxima da apresentada por **77** bem como a sua capacidade de quimiosensibilização a fármacos como a CQ. Sugere-se que a estrutura cíclica deste derivado da acridona seja essencial na ligação ao grupo heme, em que as cadeias alquilamina ionizáveis são essenciais para a acumulação no VD e que a cadeia ligada a **N10** é a responsável pela quimiosensibilização à CQ, amodiaquina, quinina e piperaquina em clones Dd2, mas não à MQ.⁽¹³⁾ Talvez estas características sejam paralelas aos derivados de quindolonas, sendo responsáveis pela actividade antimalárica e quimiosensibilizadora dos mesmos.

Capítulo 4

Conclusão

4.1. Conclusão

A malária é uma doença parasitária causada pelo género *Plasmodium* com alta taxa de morbilidade e mortalidade.⁽²⁾ Atendendo ao alastramento de resistências a todos os grupos de antimaláricos actualmente disponíveis torna-se vital actuar rapidamente sobre o parasita e controlar esta doença.^(4-6, 15, 18)

Mutações pontuais ou sobreexpressão do gene *pfmdr1* que codifica para a proteína Pgh-1 estão associadas à redução da sensibilidade a fármacos como a MQ, lumefantrina, halofantrina, quinina, artemisinina e também à CQ.^(4, 5, 7-11) Desta forma, o gene *pfmdr1* constitui um alvo a ter em consideração na reversão da resistência.⁽¹¹⁾

De facto, a par da utilização de combinações de fármacos antimaláricos de forma a evitar o ressurgimento de novos casos de resistência, surge o desenvolvimento/utilização de reversores da resistência associados aos antimaláricos.⁽¹⁰⁾ Esta via é particularmente promissora quando o composto reverte a resistência de uma forma eficaz, desprovida de efeitos secundários (inerentes ao reversor) e quando este tem um baixo custo de síntese.

Diversos compostos demonstraram ser quimiosensibilizadores ou reversores da resistência, como é o caso do verapamil e a imipramina, por modificarem a sensibilidade a fármacos antimaláricos em clones resistentes de *P. falciparum*. Mas dado o aparecimento de efeitos secundários, inerentes ao próprio agente de reversão/quimiosensibilizador, surgiu a necessidade de sintetizar novos compostos, idealmente compostos “bifuncionais”.^(12, 13)

A terminologia “compostos bifuncionais” traduz-se no uso combinado de fármacos antimaláricos e reversores da resistência (ou quimiosensibilizadores) no tratamento da malária. As acridonas sintetizadas por Kelly *et al* (2009)⁽¹³⁾, são compostos bifuncionais, por possuírem actividade antimalárica e quimiosensibilizadora a fármacos antimaláricos quinolínicos em clones *P. falciparum* Dd2.

Perante este conceito inovador, o objectivo geral deste projecto foi investigar a capacidade de derivados bis-alquilamina de quindolonas, compostos que Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾ demonstrou serem bastante activos em clones resistentes de *P. falciparum* W2, como antimaláricos e quimiosensibilizadores de fármacos quinolínicos, como a CQ e a MQ, em clones de *P. falciparum* Dd2 (resistentes à CQ e MQ).

A metodologia aplicada na síntese do núcleo de quindolona foi a de Görlitzer e Weber, adaptada por Bierer, em que os ácidos antranílicos (**63**, **64**) sofrem acilação com brometo de bromoacetilo num solvente polar como DMF, obtendo-se compostos

acilantranílicos (**65** e **66**) com altos rendimentos, de acordo com a literatura.⁽⁶⁶⁾ Segue-se a aminação dos ácidos originando derivados (**69** e **70**) com rendimentos igualmente elevados, como na literatura.^(66, 73) A formação de quindolonas (**1** e **2**) ocorre por ciclização de **65** e **66**, respectivamente, catalizada pelo PPA, com rendimentos entre os 33,6%-49,3% (produto não puro), um pouco inferiores aos apresentados por Lavrado *et al* (2010), de 40-67%.^(66, 73)

Os derivados mono e bis-alquilamina de quindolonas foram obtidos através de reacções de substituição nucleofílica com excesso da 2-cloro-*N,N*-dietiletanoamina.

Da alquilação da quindolona (**1**) obteve-se o derivado *O*-monoalquilado, **72** com rendimento de 12,3 % e o derivado *N,N*-bis-alquilado, **74**, com rendimento de 10,7 %. Seria de esperar que o derivado *N,O*-bis-alquilado (**76**) fosse o produto maioritário⁽¹⁴⁾, contudo não se conseguiu isolá-lo, apesar de o TLC da mistura reaccional demonstrar um composto com *R_f* equivalente a este composto.⁽¹⁴⁾ Já Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾ obteve o composto **76** com um rendimento de 55%, seguido de 23% de **74** e 17% de **72**.

Ao alquilar a 3,7-dicloro-quindolona (**2**) obteve o derivado *N,N*-bis-alquilado, **75** (η = 7,6%) e o *N,O*-bis-alquilado, **77** (η = 24,0%). Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾, em que o composto **77** era o maioritário com rendimento de 34% e o **75** com 19% (apesar de serem rendimentos um pouco superiores).

Todos os derivados de quindolonas sintetizados demonstraram ter um alto grau de pureza (por análise elementar), contudo é visível que a reacção não é selectiva.⁽¹⁴⁾ A formação de derivados *O*-alquilados como principais produtos na reacção de alquilação de quindolonas pode dever-se à ressonância dupla-tautomérica entre o carbonilo **C11** e **NH-5**, como em piridinonas e com **NH-10**, como em quindolonas naturais.^(66, 73)

Ainda no âmbito da síntese, efectuou-se o estudo da reacção de ciclização catalisada por PPA utilizando a técnica de microondas de forma a estudar a(s) possível(eis) vantagem(ens) da aplicação desta técnica. Ao variar o tempo da reacção entre 10 a 30 minutos e posteriormente a potência entre 50 W a 300 W, determinou-se a partir da análise dos rendimentos finais que os 15 minutos de reacção foram os que possibilitaram a formação de mais composto e que a potência ideal foi entre os 100-200 W. Os graus de pureza das quindolonas sintetizadas com estes parâmetros foram os mais altos observados. Os valores de rendimento e graus de pureza foram bem próximos dos obtidos através do método convencional com aquecimento durante duas

horas. Estes resultados demonstram que a maior vantagem da técnica por microondas na ciclização catalisada por PPA na síntese de quindolonas face ao processo convencional é a diminuição do tempo de reacção.

A actividade antimalárica dos derivados de quindolonas foi estabelecida através de ensaios *in vitro* em eritrócitos humanos infectados com 1% de *P. falciparum* em dois clones 3D7 e Dd2, tendo a actividade antimalárica dos derivados sido determinada através da técnica de microteste. Verificou-se que o composto **77** (derivado 3,7-diclorado-*N,O*-bis-alquilamina) possuía a actividade antimalárica mais alta em clones de *P. falciparum* resistentes Dd2 (227 nM), bastante próximo do apresentado para a CQ (180 nM) e o composto com menor actividade antimalárica era o monoalquilado, **72**, com um IC₅₀ superior a 10 µM para o mesmo clone. Estes resultados são corroborados pelos obtidos por Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾, cuja actividade antimalárica foi testada em clones de *P. falciparum* resistentes W2.

Foi igualmente visível que a introdução de duas cadeias alquilamina aumentava a actividade antimalárica (comparando por exemplo o composto **72** com **76**), em ambos os clones, tal como o identificado por Lavrado *et al* (2010).⁽¹⁴⁾ Pensa-se que este facto se deva à acumulação da molécula no VD, após ionização das aminas das cadeias laterais, que por apresentarem carga positiva não sofrem efluxo.⁽¹⁴⁾

Em relação à introdução de cloros no núcleo da quindolona em **C3** e **C7**, identificou-se um aumento da actividade antimalárica tanto para os compostos *N-N*-bis-alquilamina como para os *N-O*-bis-alquilamina, sendo mais significativo nestes últimos compostos em ambos os clones testados. Lavrado *et al* (2010)⁽¹⁴⁾ verificou também um aumento significativo na actividade antimalárica com a introdução de cloros em **C3** e **C7** da quindolona nos derivados *N,O*-bis-alquilamina, para o clone resistente de *P. falciparum* W2.⁽¹⁴⁾ De facto, a introdução de cloros no núcleo aromático de 4-aminoquinolinas, estabiliza a ligação à hemozoína, o que se pode transpor igualmente para os derivados da quindolona.⁽⁸¹⁾

Os compostos **75** e **77** apresentaram um IR inferior ao da MQ (1,3 e 1,5, versus 2,9) e da CQ (9,8), indicando a alta capacidade de os mesmos superarem o fenómeno de resistência.

Ao verificar que **77** apresentava a actividade antimalárica mais elevada, foi avaliada a capacidade quimiosensibilizadora do composto em clones resistentes de *P. falciparum* Dd2. Ao testar 100 nM do composto em combinação com CQ e com MQ, verificou-se que a combinação de CQ + **77** tinha um valor de IMR de 0,205 e a combinação MQ +

77 (100nM) de 0,432, o que indicava que o composto **77** era quimiosensibilizador em clones de *P. falciparum* Dd2, para a CQ e MQ.

Melhorar o uso de antimaláricos existentes combinando-os com novos compostos é essencial para retardar o aparecimento de resistência aos antimaláricos. De facto o uso de terapêuticas combinadas é aconselhado pela WHO.^(5, 82)

Assim a associação de agentes reversores da resistência (ou quimiosensibilizadores) a antimaláricos, compostos bifuncionais, tem diversas vantagens tais como: a continuação da utilização de fármacos (como a CQ) mais baratos e largamente disponíveis em zonas como o continente africano e uso de compostos com elevada segurança em grávidas e crianças (como a CQ).^(13, 58)

Desta forma o composto **77**, com uma apreciável actividade antimalárica, que demonstrou ter selectividade para a fase eritrocitária⁽¹⁴⁾, baixa citotoxicidade⁽¹⁴⁾ e ser quimiosensibilizador para a CQ e MQ em clones de *P. falciparum* Dd2, evidenciou ser bastante promissor face à actual situação de resistência aos antimaláricos.

Assim, diversos estudos futuros poderão ser efectuados nesta temática e com este composto, tais como determinar actividade quimiosensibilizadora do composto em contacto com outros antimaláricos e em clones de *P. falciparum* sensíveis 3D7, de forma a determinar qual o papel do *pfmdr1* na actividade quimiosensibilizadora. A construção de isobologramas indicará igualmente se o efeito quimiosensibilizador é sinérgico ou apenas aditivo.

Capítulo 5

Procedimiento Experimental

5.1. Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados tanto na síntese como na análise biológica da actividade foram adquiridos através da Aldrich Chemical Company Ltd e Merck e foram usados sem purificação adicional.

A acetona utilizada na síntese foi destilada antes da sua utilização.

Os solventes deuterados usados para RMN foram clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) adquiridos na Merck.

A água utilizada foi destilada e purificada com auxílio a um sistema MilliQ, que utiliza uma resina de troca iónica Millipore, pertencente à Millipore Ltd.

5.2. Equipamentos

Para determinar os **pontos de fusão** (p.f.) utilizou-se uma câmara de Kofler Bock-Monoscop “M”, que mede no intervalo de 0°C a 330°C .

Os espectros de **Ressonância Magnética Nuclear** foram registados num espectrómetro Bruker 400 Ultrashield 400 MHz, operando a 400.1 MHz para a determinação do ^1H e a 100.6 MHz para ^{13}C NMR. Os desvios químicos são apresentados em ppm (partes por milhão) em relação ao tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento (J) são apresentadas em Hertz (Hz). As seguintes abreviaturas foram estabelecidas para o desdobramento spin-spin: s (singuleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete).

A análise elementar foi efectuada num analisador LECO, modelo CHNS-932 pela Unidade de Análise Elementar da Universidade de Santiago de Compostela, em Espanha.

Na determinação do número de parasitas viáveis foi utilizado o microscópio óptico Olympus, modelo BX40F, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

5.3. Métodos Utilizados

De forma a seguir o desenvolvimento das reacções, utilizou-se a técnica de cromatografia em cama fina (TLC) usando placas de sílica gel (Merck, sílica gel 60 F_{254} , com 200 μm de espessura e partículas de 25 μm em folhas de alumínio) ou em placas de óxido de alumínio (Sigma-Aldrich, 60 Å de diâmetro de poro e 200 μm de

espessura da camada). Na revelação das placas cromatográficas recorreu-se a uma Câmara de UV CAMAG, com leitura a comprimento de onda 254 nm e a 365 nm.

Na purificação dos compostos utilizou-se a técnica de cromatografia em camada fina preparativa em placas de sílica gel (Merck, sílica gel 60 GF254, 750 µm de espessura da camada) ou placas de óxido de alumínio (Merck, matriz de óxido de alumínio com espessura de 250 µm e 60 Å de diâmetro de poro).

Foi igualmente utilizada a técnica de cromatografia por coluna com óxido de alumínio como fase estacionária (Sigma-Aldrich, com tamanho do poro de 58 Å de tamanho de poro e actividade Brockmann I), nomeadamente na técnica de purificação do produto reaccional obtido na alquilação do núcleo de **2**.

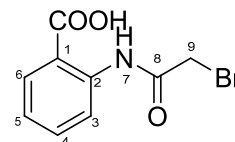
Na determinação da inibição do crescimento dos parasitas, foi usada a técnica de Microtestes.

5.4. Síntese Geral de Derivados do Núcleo de Quindolona

5.4.1. Síntese dos Ácidos 2-(2-bromoacetamido) benzóico

5.4.1.1. Síntese do ácido 2-(2-bromoacetamido) benzóico (**65**)

Na síntese do composto **65**, pesou-se 10,0 g de ácido antranílico (72,9 mmol) e adicionou-se 25,0 mL de DMF e 25,0 mL de 1,4-Dioxano. Posteriormente colocou-se a solução obtida a temperatura 0°C e adicionou-se gota a gota de brometo de bromoacetilo (6,4 mL, 14,7g, 73,7 mmol) durante 20 minutos, mantendo a temperatura a 0°C, visto que a reacção é exotérmica. Após a adição, retirou-se o banho de gelo e manteve-se o meio reaccional sob agitação, à temperatura ambiente, durante a noite.

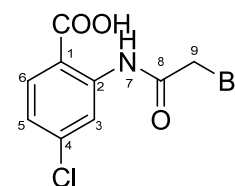


Quando a reacção terminou, acrescentou-se 300 mL de água a 0°C e obteve-se um precipitado amarelo, que foi filtrado, lavado e seco por evaporação do solvente no sistema de vácuo. O composto obtido, **65** (massa = 14,7 g, η = 78,0%), constituía um pó branco de p.f. 162-165°C.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) δH (ppm) 11,61 (s, 1H) (**H7**), 8,45 (d, J = 8,1 Hz, 1H) (**H3**), 8,01 (d, J = 7,8 Hz, 1H) (**H6**), 7,63 (dd, 8,8, 8,1 Hz, 1H) (**H4**), 7,22 (dd, J = 8,8, 7,8 Hz, 1H) (**H5**), 4,26 (s, 2H) (**H9**).

5.4.1.2. Síntese do ácido 2-(2-bromoacetamido)-4-clorobenzóico (**66**)

Na síntese de **66**, juntou-se ácido 2-amino-4-clorobenzóico (10,0 g, 58,3 mmol) a brometo de bromoacetilo (5,08 mL, 11,85 g, 58,7 mmol) segundo o mesmo processo utilizado no composto **65**. Obteve-se 12,14 g (η = 71,2%) de **66**, que apresentava sob a forma de um pó amarelo com p.f. de 166-168 °C.

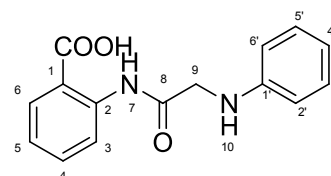


RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm) 11,72 (s, 1H) (**H7**), 8,56 (s, 1H) (**H3**), 8,01 (d, J = 8,8 Hz, 1H) (**H6**), 7,29 (d, J = 8,8 Hz, 1H) (**H5**), 4,29 (s, 2H) (**H9**).

5.4.2. Síntese dos Ácidos 2-[2-(fenilamino)acetamido] benzóicos

5.4.2.1. Síntese do ácido 2-(2-(fenilamino)acetamido) benzóico (**69**)

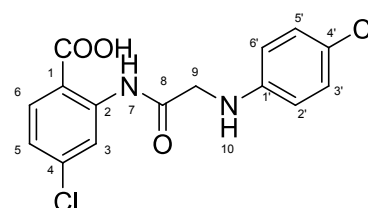
Para obter o composto **69** fez-se reagir em DMF (90 mL) o **65** (14,0 g, 54,25 mmol) com a anilina (**67**, 15,5 mL, 170,0 mmol) a 120 °C durante 24h. Finda a reacção deixou-se arrefecer a mesma, adicionando-lhe posteriormente água a 0°C (500 mL). De forma a dissolver o precipitado obtido juntou-se lentamente solução aquosa de NaOH a 5% (ajustando o pH a 10-11). Procedeu-se à extracção líquido-líquido usando diclorometano (300 mL x 3), ficando a anilina que não reagiu na fase orgânica e o meio reaccional na fase aquosa. Acidificou-se a fase aquosa com solução de HBr a 5% e o precipitado formado foi filtrado, lavado e seco no sistema de vácuo. O composto **69** obtido tinha 10,7 g (η = 72,7%), apresentando-se como um pó branco com p.f. de 195-197°C.



RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm) 12,02 (s, 1H) (**H7**), 8,73 (d, J = 8,3 Hz, 1H) (**H3**), 7,94 (d, J = 7,9 Hz, 1H) (**H6**), 7,60 (dd, J = 8,8, 8,3 Hz, 1H) (**H4**), 7,14 (m, 1H) (**H5**), 7,10 (dd, J = 7,6, 7,2 Hz, 2H) (**H3'**, **H5'**), 6,62 (d, J = 7,2 Hz, 1H) (**H4'**), 6,59 (d, J = 7,6 Hz, 2H) (**H2'**, **H6'**), 6,50 (s, 1H) (**H10**), 3,83 (d, J = 4,3 Hz, 2H) (**H9**).

5.4.2.2. Síntese do ácido 4-cloro-2-[2-[(4-clorofenil)amino]acetamido]benzóico (**70**)

Na síntese de **70**, adicionou-se **66** (10,0 g, 34,2 mmol) a 4-cloro-anilina (**68**, 9,8, mL, 9,7 g, 76,2 mmol, 2,2 eq.) em DMF (60 mL) a 120°C durante 48h, seguindo o procedimento que foi seguido para **69**. Obteve-se 7,5 g



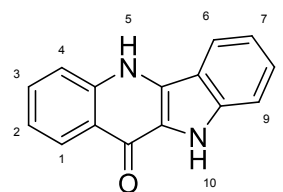
(η = 64,7%) de **70**, um pó branco com p.f. de 196-198°C.

^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm) 12,08 (s, 1H) (**H7**), 8,81 (d, J = 2,2 Hz, 1H) (**H3**), 7,95 (d, J = 8,5 Hz, 1H) (**H6**), 7,22 (dd, J = 8,5, 2,2 Hz, 1H) (**H5**), 7,13 (d, J = 8,8 Hz, 2H) (**H3'**, **H5'**), 6,73 (s, 1H) (**H10**), 6,60 (d, J = 8,8 Hz, 2H) (**H2'**, **H6'**), 3,87 (d, J = 5,6 Hz, 2H) (**H9**).

5.4.3. Síntese da 5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-onas (Quindolonas)

5.4.3.1. Síntese da 5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**1**)

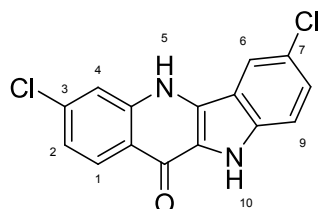
Fez-se reagir **69** (5,0 g, 18,5 mmol) com PPA (175 g) durante 2h a 130°C (com agitação mecânica). Após arrefecer, adicionou-se 500 mL de água a 0°C à mistura reaccional, mantendo a temperatura a 0°C. Neutralizou-se o pH com solução aquosa saturada de KOH e procedeu-se à extracção líquido-líquido com AcOEt (500 mL x 3). A fase orgânica foi lavada com água e solução aquosa saturada de NaCl, removendo-se a água residual de água com Na_2SO_4 anidro e evaporou-se o solvente. O composto obtido, **1**, apresenta-se sob a forma de um pó verde-escuro, de massa 1,46 g (η = 33,6%). Visto que o **1** apresentava-se impuro, procedeu-se à recristalização do composto, dissolvendo o mesmo em AcOEt e adicionando aos poucos éter dietílico:hexano (9:1). Filtrou-se e após seco, obteve-se 1,04 g (η = 23,9 %) de **1**, com cor verde clara, com p.f. superior a 330°C.



^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm) 12,47 (s, 1H) (**H5**), 11,72 (s, 1H) (**H10**), 8,37 (d, J = 8,2 Hz, 1H) (**H1**), 8,20 (d, J = 8,2 Hz, 1H) (**H6**), 7,74 (d, J = 8,5 Hz, 1H) (**H4**), 7,68 (dd, J = 8,5, 7,6 Hz, 1H) (**H3**), 7,53 (d, J = 8,3 Hz, 1H) (**H9**), 7,47 (dd, J = 8,3, 7,5 Hz, 1H) (**H8**), 7,29 (dd, J = 8,2, 7,6 Hz, 1H) (**H2**), 7,21 (dd, J = 8,2, 7,5 Hz, 1H) (**H7**).

5.4.3.2. Síntese da 3,7-dicloro-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**2**)

Adicionou-se **70** (5,0 g, 14,7 mmol) a PPA (140,0 mg), seguindo o procedimento adoptado para **1**. Obteve-se um composto sob a forma de pó verde-escuro de 2,29 g de massa (η = 49,2%), que após recristalizado (segundo a mesma técnica utilizada para o **1**), originou um pó verde-claro, de massa 0,9147 g (η = 20,5%, **2**), com p.f. superior a 330°C.



^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 12,64 (s, 1H) (**H5**), 12,02 (s, 1H) (**H10**), 8,33 (d, J = 8,7 Hz, 1H) (**H1**), 8,22 (d, J = 1,3 Hz, 1H) (**H6**), 7,70 (d, J = 1,6 Hz, 1H) (**H4**), 7,53 (d, J =

8,8 Hz, 1H) (**H9**), 7,48 (dd, $J = 8,8, 1,3$ Hz, 1H) (**H8**), 7,30 (dd, $J = 8,7, 1,6$ Hz, 1H) (**H2**).

5.4.4. Reacção de Alquilação da Quindolona

Fez-se reagir **1** (75,0 mg, 0,32 mmol) com 2-cloro-*N,N*-dietiletanamina (**71**, 220,2 mg, 1,28 mmol), K_2CO_3 (663,3 mg, 4,8 mmol, 15 eq.), NaI (191,8 mg, 1,28 mmol, 4 eq.) em acetona destilada (30 mL), durante a noite, em refluxo a 70°C.

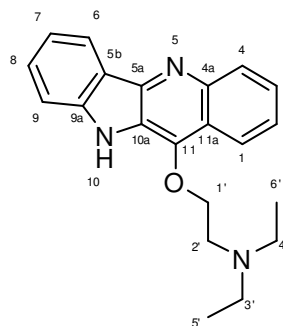
Após término da reacção (verificado por TLC) evaporou-se a acetona e adicionou-se 60 mL de água. Efectuou-se a extracção líquido-líquido com CH_2Cl_2 (60 mL x 3), aproveitando-se a fase orgânica, lavando-a com água, solução aquosa saturada de NaCl e secando a água residual com Na_2SO_4 anidro. Reduziu-se o solvente e procedeu-se à separação da mistura por cromatografia em camada fina. Utilizou-se para tal, placas preparativas de óxido de alumina, com eluente AcOEt:Hex (9:1). Terminada a eluição, delimitou-se as bandas obtidas e procedeu-se à extracção dos compostos com CH_2Cl_2 :MeOH (85:15). Das bandas obtidas, delimitou-se a banda com R_f 0,85 que demonstrou, por RMN de H^1 , conter a mistura dos produtos pretendidos. Assim sendo, submeteu-se a mistura obtida (56,5 mg) a uma nova separação por preparativa de óxido de alumínio, com eluente AcOEt:Hex (8:2). Desta purificação obteve-se: 2-[(10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il)oxi]-*N,N*-dietiletanamina (**72**, 13,2 mg, 12,3 %, R_f 0,82) e 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**74**, 14,9 mg, 10,7 %, R_f 0,63) sob a forma de óleos de cor amarela. Procedeu-se à precipitação dos compostos sob a forma de cloretos, com HCl em éter dietílico.

Relativamente a **72** e ao **74** os estudos de RMN foram efectuados na forma de óleo e a análise elementar e ponto de fusão, sob a forma de sal.

5.4.4.1. 2-[(10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il)oxi]-*N,N*-dietiletanamina (**72**)

P.f. 193-195°C.

RMN de H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 12,51 (s, 1H) (**H10**), 8,46 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H) (**H6**), 8,25 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) (**H4**), 8,22 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H) (**H1**), 7,57 (dd, $J = 8,3, 7,0$ Hz, 1H) (**H8**), 7,51 (dd, $J = 8,0, 6,9$ Hz, 1H) (**H3**), 7,45 (dd, $J = 8,4, 6,9$ Hz, 1H) (**H2**), 7,38 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) (**H9**), 7,22 (dd, $J = 7,9, 7,0$ Hz, 1H) (**H7**), 4,50 (t, $J = 4,4$ Hz, 2H) (**H1'**), 3,00 (t, $J = 4,4$ Hz, 2H) (**H2'**), 2,82 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H) (**H3'**, **H4'**), 1,18 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H) (**H5'**,



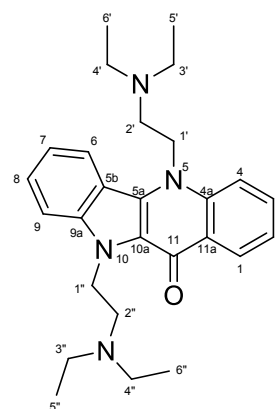
H6'). RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} 148,66 (**C5a**), 145,48 (**C4a**), 144,60 (**C11**), 143,57 (**C9a**), 129,45 (**C3**), 128,88 (**C1**), 126,53 (**C8**), 124,28 (**C2**), 123,95 (**C10a**), 122,48 (**C5b**), 122,20 (**C6**), 121,45 (**C11a**), 120,96 (**C4**), 119,42 (**C7**), 111,11 (**C9**), 73,76 (**C1'**), 54,98 (**C2'**), 48,52 (**C3'**, **C4'**), 11,22 (**C5'**, **C6'**).

Análise elementar (C, H, N): Cálculos para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O} \cdot 4,6\text{HCl}$: C, 50,33, H, 5,55, N, 8,38, encontrado: C, 50,71, H, 5,45, N, 8,01.

5.4.4.2. 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**74**)

P.f. 229-231 °C.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm) 8,61 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) (**H1**), 8,18 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H) (**H6**), 7,64 (m, 2H) (**H3**, **H4**), 7,58 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H) (**H9**), 7,49 (dd, $J = 8,7$, 7,4 Hz, 1H) (**H8**), 7,28 (dd, $J = 8,0$, 4,7 Hz, 1H) (**H2**), 7,19 (m, 1H) (**H7**), 4,98 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H) (**H1''**), 4,79 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H) (**H1'**), 2,97 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H) (**H2'**), 2,91 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H) (**H2''**), 2,68 (m, 8H) (**H3'**, **H4'**, **H3''**, **H4''**), 1,04 (t, $J = 7,1$ Hz, 12H) (**H5'**, **H6'**, **H5''**, **H6''**). RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm) 169,11 (**C11**),



139,73 (**C9a**), 139,67 (**C4a**), 131,48 (**C3**), 130,77 (**C5a**), 127,58 (**C8**), 126,82 (**C1**), 124,87 (**C11a**), 122,63 (**C6**), 121,07 (**C2**), 119,72 (**C7**), 115,18 (**C5b**), 114,20 (**C4**), 110,73 (**C9**), 52,95 (**C2'**), 50,88 (**C2''**), 47,70 (**C3'**, **C4'**), 47,50 (**C3''**, **C4''**), 47,36 (**C1'**), 42,65 (**C1''**), 11,86 (**C5'**, **C6'**, **C5''**, **C6''**).

Análise elementar (C, H, N): Cálculos para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O} \cdot 7,5\text{HCl} \cdot 0,1\text{H}_2\text{O}$: C, 45,81, H, 6,22, N, 7,91, encontrado: C, 46,18, H, 6,23, N, 7,38.

5.4.5. Reacção de Alquilação da 3,7-dicloroquindolona

Fez-se reagir **2** (100,0 mg, 0,33 mmol) com cloreto de 2-N,N-dietiletanamina (**71**, 227,1 mg, 1,32 mmol), a K_2CO_3 (684,1 mg, 4,95 mmol), NaI (197,8 mg, 1,32 mmol) em 30 mL de acetona destilada, nas mesmas condições escritas no procedimento 5.4.4. Procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna, em óxido de alumina, iniciando a eluição com $\text{AcOEt}:\text{Hex}$ (1:1), aumentando a polaridade do solvente (75:25, 85:15, 90:10). No fim obtiveram-se 14 fracções que foram analisadas por RMN de ^1H . Dessas fracções nenhuma correspondia aos produtos pretendidos, procedendo-se a posterior eluição da mistura que ficou retida na coluna com AcOEt (100%), seguido por purificação por cromatografia em camada fina (em preparativa de

óxido de alumina e eluente CH₂Cl₂:AcOEt (4:2)). Da purificação obteve-se o composto 2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il]oxi]-*N,N*-dietiletanamina (**77**, 21,1 mg, 12,8%, R_f 0,88), sob a forma de óleo de cor amarela. Procedeu-se à precipitação do composto sob a forma de cloreto, com HCl em éter dietílico.

As bandas com R_f 0,74 e a R_f 0,58, apareceram contaminadas com os 2 produtos dialquilados, mas como possuíam apenas 4,1 mg e 5,5 mg (respectivamente) não se efectuou nova purificação, sendo inutilizadas.

Paralelamente repetiu-se a mesma reacção de introdução da mesma cadeia em **2**, sendo feita a purificação por cromatografia de camada fina em placas de óxido de alumina, com eluente AcOEt:Hex:NEt₃ (47.5:47.5:5). Resultante desta eluição delimitou-se a banda com R_f 0,9 (massa 59,7 mg), que demonstrou uma mistura de dois compostos pelo RMN de ¹H. Esta mistura foi submetida novamente a uma separação pela mesma técnica, com eluente CH₂Cl₂:AcOEt:NEt₃ (76:19:5). Da purificação identificou-se os produtos 2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il]oxi]-*N,N*-dietiletanamina (**77**, 36,6 mg, 24,0%, R_f 0,92) e 3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**75**, 11,6 mg, 7,6%, R_f 0,81). Ambos foram passados a cloretos, formando sais de cor amarela.

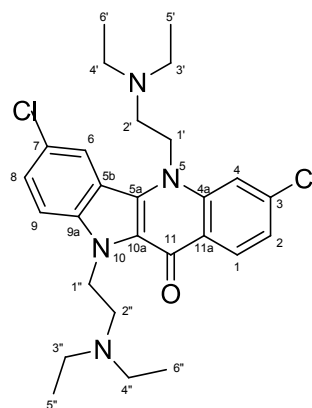
Os estudos de RMN para **75** e **77** foram efectuados na forma de óleo e a análise elementar e ponto de fusão, sob a forma de sal.

5.4.5.1. 3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (**75**)

P.f. de 231-233°C.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,45 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H) (**H1**), 8,17 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H) (**H6**), 7,73 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H) (**H9**), 7,64 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H) (**H4**), 7,46 (dd, *J* = 9,0, 1,7 Hz, 1H) (**H8**), 7,22 (dd, *J* = 8,7, 1,5 Hz, 1H) (**H2**), 5,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H) (**H1''**), 4,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H) (**H1'**), 3,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H) (**H2''**), 2,95 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H) (**H2'**), 2,84 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H) (**H3''**, **H4''**), 2,64 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H) (**H3'**, **H4'**), 1,15 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H) (**H5''**, **H6''**), 1,03 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H) (**H5'**, **H6'**).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ_c (ppm) 168,65 (**C11**), 140,52 (**C3**), 138,30 (**C9a**), 137,96 (**C5a**), 130,20 (**C4a**), 128,64 (**C8**), 128,19 (**C1**), 126,04 (**C10a**), 123,09 (**C11a**), 123,02 (**C5b**), 122,17 (**C2**), 121,75 (**C6**), 114,54 (**C4**), 112,49 (**C9**), 52,19 (**C2''**)



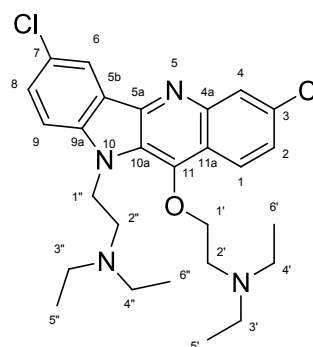
50,98 (**C2'**), 47,93 (**C3'**, **C4'**), 47,79 (**C1'**), 47,05 (**C3''**, **C4''**), 41,35 (**C1''**), 29,72 (**C5''**, **C6''**), 11,92 (**C5'**, **C6'**).

Análise elementar (C, H, N): Cálculos para $C_{27}H_{34}Cl_2N_4O \cdot 0,6,9HCl$: C, 43,06, H, 5,47, N, 7,44, encontrado: C, 43,08, H, 5,38, N, 7,42.

5.4.5.2. 2-[[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10H-indolo[3,2-b]quinolin-11-il]oxi]-N,N-dietiletanamina (77)

P.f. de 146-148 °C;

RMN de 1H 400 MHz, $CDCl_3$ δ (ppm) 8,35 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H) (**H6**), 8,27 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) (**H1**), 8,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) (**H4**), 7,50 (dd, $J = 8,7, 2,1$ Hz, 1H) (**H8**), 7,41 (dd, $J = 9,0, 2,0$ Hz, 1H) (**H2**), 7,36 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H) (**H9**), 4,60 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H) (**H1''**), 4,19 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H) (**H1'**), 2,96 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H) (**H2'**), 2,71 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H) (**H2''**), 2,61 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H) (**H3'**, **H4'**), 2,51 (q, $J = 7,1$



Hz, 4H) (**H3''**, **H4''**), 1,03 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H) (**H5'**, **H6'**), 0,87 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H) (**H5''**, **H6''**). RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 148,12 (**C5a**), 146,19 (**C4a**), 145,05 (**C11**), 143,12 (**C9a**), 132,70 (**C3**), 129,95 (**C8**), 128,08 (**C4**), 125,92 (**C2**), 125,66 (**C7**), 125,29 (**C10a**), 123,34 (**C5b**), 122,88 (**C1**), 121,73 (**C6**), 120,77 (**C11a**), 110,55 (**C9**), 74,99 (**C1'**), 53,07 (**C2'**), 51,76 (**C2''**), 47,65 (**C3'**, **C4'**), 47,53 (**C3''**, **C4''**), 43,59 (**C1''**), 11,80 (**C5'**, **C6'**, **C5''**, **C6''**).

Análise elementar (C, H, N): Cálculos para $C_{27}H_{34}Cl_2N_4O \cdot 0,5HCl \cdot 0,2H_2O$: C, 47,18, H, 5,78, N, 8,15, encontrado: C, 47,09, H, 5,83, N, 8,12.

5.5. Ciclização do ácido 2-[2-(Fenilamino)acetamido] benzóico pelo Ácido Polifosfórico através do Método de Microondas

Nesta síntese fez-se reagir **69** (250,0 mg, 0,92 mmol) com PPA (9,0 g), variando o tempo (**1A-D**) e a potência (**1E-H**) utilizando a técnica de microondas e variando apenas o tempo com a metodologia sem microondas (**1I** e **1J**). O restante procedimento foi o seguido na síntese do composto **1** (secção 5.4.3.1.). A purificação do produto reaccional foi efectuada por cromatografia de camada fina, utilizando placas preparativas de sílica e o eluente AcOEt:Hex (9:1), partindo de 20,0 mg produto. Após a eluição, identificou-se a banda correspondente à quindolona (que imitia fluorescência de cor roxa a 254 nm) e procedeu-se à desadsorção do composto da sílica, dissolvendo esta numa mistura de CH₂Cl₂:MeOH (85:15), filtrando e evaporando o solvente remanescente.

Efectuou-se um TLC comparativo de todos os produtos reacioanais, bem como espectro de RMN de H¹ dos mesmos e das quindolonas purificadas.

5.6. Ensaios de Susceptibilidade da Fase Eritrocitária do *Plasmodium falciparum* aos Compostos Sintetizados

Os ensaios *in vitro* efectuados com derivados de quindolona foram realizados em culturas de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* segundo a técnica de microteste (MARK III - OMS).⁽⁸³⁾ Os IC₅₀ foram determinados a partir da percentagem de inibição de parasitas com o programa Graph PadPrism 5[®].

5.6.1. Cultura de *Plasmodium falciparum*

A cultura de *P. falciparum* foi efectuada segundo a técnica de Trager e Jensen 1976⁽⁸⁴⁾, que consiste na manutenção de eritrócitos parasitados em meio de cultura RPMI, numa camada estacionária superficial em frascos descartáveis, cujo hematócrito é de 5%.

O meio de cultura é constituído por RPMI 1640 suplementado com tampão HEPES 25 nM, Hipoxantina 6,8 M, solução de bicarbonato de sódio a 5% e água destilada. O meio de cultura é designado de completo quando se adiciona 10% de Albumax II (soro de sangue bovino); sendo filtrado com recurso ao sistema de filtração Stericup (Sterivex-GS 0,22 µm, Millipore) e armazenado na estufa a 37°C.

O meio de cultura foi mudado diariamente e o hematócrito mantido a 5% (quando necessário adicionou-se eritrócitos sãos).

As culturas foram incubadas a 37°C, com uma mistura gasosa de azoto, dióxido de carbono e oxigénio (95:3:2).

Para se realizar os ensaios, a cultura tem que estar sincronizada na fase de anel, ou seja, o estadio de desenvolvimento do *P. falciparum* ser maioritariamente sob a forma de anel (trofozoíto), mais precisamente o número de anéis tem que ser superior a 90% do número total de parasitas. Desta forma, adicionou-se sorbitol a 5% de 48h em 48h, para manter as culturas sincronizadas.

5.6.2. Preparação das Soluções dos Fármacos de Referência e Compostos Sintetizados

A partir da CQ em pó (C6628, Sigma, grau pureza ≥ 98%) preparou-se uma solução stock a 94 mM, diluindo o fármaco em meio RPMI incompleto. Filtrada a solução com uma membrana de poro 0,22 µm, efectuaram-se mais 3 soluções intermédias com RPMI completo (Solução A a 9,4 mM, Solução B a 0,94 mM e Solução C 0,094 mM).

Da solução C prepararam-se as soluções utilizadas para os ensaios, iniciando-se com a concentração de 640 nM de CQ e efectuando-se diluições seriadas de 1:2 (com meio RPMI) para as restantes concentrações (Tabela 9).

Para a solução-stock de MQ (M2319, Sigma, grau pureza $\geq 98\%$), dilui-se o fármaco numa quantidade mínima de etanol a 80% até se obter uma solução transparente, perfazendo com meio RPMI incompleto uma solução de 10 mM, sendo posteriormente filtrada. Desta prepararam-se três soluções intermédias com RPMI completo (Solução A a 1 mM, Solução B a 0,1 mM e Solução C 0,01 mM). Da solução C preparou-se a solução de 1280 nM e as seguintes concentrações foram efectuadas com diluições seriadas de 1:2 com meio RPMI (Tabela 9).

Efectuaram-se soluções de 5 nM em DMSO dos derivados da quindolona (**72**, **74**, **75**, **76** e **77**) e das soluções-mãe prepararam-se soluções intermédias de 50 μ M com meio RPMI completo. Destas soluções prepararam-se soluções de 10000 nM de cada um dos compostos e as restantes concentrações foram efectuadas com diluições seriadas de 1:10, com RPMI completo (Tabela 9).

Tabela 9. Compostos utilizados nos ensaios *in vitro* e respectivas concentrações em nM

CQ	640	320	160	80	40	20	10
MQ	1280	640	320	160	80	40	20
72	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
74	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
75	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
76	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
77	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01

5.6.3. Ensaios *In Vitro* pela Técnica de Microteste para Determinação da actividade antimalárica

Numa placa de 96 poços aplicou-se 90 μ L de cada solução de fármaco (Tabela 9) em duplicado, da menor concentração para a maior, usando-se meio de cultura RPMI como controlo. Posteriormente colocou-se 10 μ L de cultura com parasitemia de 0,5% (constituída por 50% de cultura e 50% de meio de cultura) em cada poço, perfazendo um hematócrito final de 5%. Incubou-se durante 24h na estufa a 37°C.

Para a avaliação e determinação da parasitemia, foram realizados esfregaços da cultura, corando-os com solução de giemsa a 20% durante 30 minutos, para posterior observação por microscopia óptica.

Findo o tempo de incubação, retirou-se o sobrenadante de cada um dos poços e numa lâmina foram efectuadas gotas espessas de eritrócitos correspondentes a cada concentração de fármaco. Após secagem das mesmas foram coradas com uma solução de giemsa a 1% durante 1 hora.

No microscópio óptico foi contado o número de esquizontes viáveis, isto é, com 3 ou mais núcleos de hemozoína definidos, num total de 200 parasitas assexuados.⁽⁸³⁾

O número de esquizontes relativamente ao número total de parasitas foi utilizado para calcular a percentagem de inibição de crescimento de cada uma das concentrações de fármaco e por interpolação linear o valor de IC_{50} , ou seja, a concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas. Segundo a OMS, estes ensaios apenas são considerados viáveis se o número de esquizontes no controlo for igual ou superior a 10%.⁽⁸³⁾ As percentagens de inibição do crescimento foram obtidas relativamente ao controlo sem fármaco.

Para cada composto foram efectuados 3 ensaios independentes (com soluções e culturas independentes) para cada um dos clones.

5.6.4. Ensaios *In Vitro* pela Técnica de Microteste para Estudo da Quimiosensibilização

O estudo de quimiosensibilização pretendeu verificar se ao testar cada um dos fármacos de referência (CQ e MQ) com uma determinada concentração fixa do composto **77**, ocorria alteração no valor de IC_{50} dos fármacos. Desta forma, numa placa de 96 poços aplicou-se 45 μ L de **77** a 200 nM em duplicado e 45 μ L de cada uma das concentrações de CQ (iniciando com 1280 nM, com diluições seriadas de 1:2 até 20 nM) da menor concentração para a maior, usando-se 90 μ L de meio de cultura RPMI como controlo. Posteriormente colocou-se 10 μ L de cultura parasitada de Dd2 a 0,5% em cada poço, perfazendo um hematócrito final de 5%. Sempre que necessário diluiu-se a cultura parasitada com eritrócitos sãs a 50% de forma a obter a parasitémia de 0,5%. Incubou-se durante 24h na estufa a 37°C.

Efectuou-se o mesmo para o composto **77** com a MQ (concentrações de 2560 nM a 40 nM).

O restante procedimento foi igual ao relatado na técnica de microtestes para a determinação de IC_{50} . Fez-se a leitura das lâminas de microtestes.

Cada ensaio foi efectuado três vezes, com soluções e culturas independentes.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. WHO. Malaria, countries or areas at risk of transmission, 2009. 2009 [23 de Maio de 2011]; Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241580458_spa_World_Maps_Cont.II.pdf.
2. WHO. World Malaria Report 2010. WHO Global Malaria Programme. 2010.
3. Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, et al. The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. PLoS Medicine. 2008;5(2):300-11.
4. Enayati A, Hemingway J. Malaria Management: Past, Present, and Future. Annual Review of Entomology. 2010;55:569-91.
5. Grimberg BT, Mehlotra RK. Expanding the Antimalarial Drug Arsenal—Now, But How? Pharmaceuticals. 2011;4:681-712.
6. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. The new england journal of medicine. 2009;361:455-67.
7. Hayton K, Su X-z. Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. Current Genetics. 2008;54:223-39.
8. Johnson D, Owen A, Plant N, Bray P, Ward S. Drug-Regulated Expression of *Plasmodium falciparum* P-Glycoprotein Homologue 1: a Putative Role for Nuclear Receptors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008;52(4):1438-45.
9. Wellems T, Plowe C. Chloroquine-Resistant Malaria. The Journal of Infectious Diseases. 2001;184:770-6.
10. Martinelli A, Moreira R, Cravo P. Malaria Combination Therapies: Advantages and Shortcomings. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2008;8(3):201-12.
11. Duraisingh MT, Cowmanb AF. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. Acta Tropica. 2005;94:181-90.
12. Nzila A, Chilengi R. Modulators of the efficacy and toxicity of drugs in malaria treatment. Trends in Pharmacological Sciences. 2010;31:277-83.
13. Kelly JX, Smilkstein MJ, Brun R, Wittlin S, Cooper RA, Lane KD, et al. Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. Nature. 2009;459:270-3.
14. Lavrado J, Gani K, Nobre PA, Santos SA, Figueiredo P, Lopes D, et al. Bis-alkylamine quindolone derivatives as new antimalarial leads. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2010;20:5634–7.
15. Abraham D. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6 ed. New York: John Wiley & Sons, INC; 1994.
16. Vale N, Moreira R, Gomes P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. Química. 2005;099:57-69.

17. White N. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46:172-3.
18. White NJ. Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(8):1084-92.
19. Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 2004;3:509-20.
20. Winstanley PA, Ward SA, Snow RW. Clinical status and implications of antimalarial drug resistance. *Microbes and Infection*. 2002;4:157–64.
21. Hospital RP. Laboratory Diagnosis. 2003 [20 de Maio de 2011]; Available from: <http://www.rph.wa.gov.au/malaria/diagnosis.html>.
22. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1266-76.
23. Sullivan DJ, Krishna S. In *Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology*. In: Goldberg DE, editor. *Hemoglobin Degradation* 2005. p. 275-91.
24. Goldberg DE, Slater AFG, Beavis R, Chait B, Cerami A, Henderson GB. Hemoglobin Degradation in the Human Malaria Pathogen *Plasmodium falciparum* : A Catabolic Pathway Initiated by a Specific Aspartic Protease. *J Exp Med*. 1991;173 961-9.
25. Hyde J. Drug-resistant malaria - an insight. *FEBS J*. 2007;274(18):4688-98.
26. Schalkwyk D, Egan T. Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resistance Updates*. 2006;9:211-26.
27. Schlitzer M. Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem*. 2007;2:944-86.
28. Krudsood S, Wilairatana P, Tangpukdee N, Chalermut K, Srivilairit S, Thanachartwet V, et al. Safety and tolerability of elubiquine (Bulaquine, CDRI 80/53) for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*. 2006;44:221-8.
29. Cui L, Su X-z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2009;7(8):999-1013.
30. Fidock DA, Eastman RT, Ward SA, Meshnick SR. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends in Parasitology* 2008;24(12):537-44.
31. Bloland PB. Drug resistance in malaria. 2001 [20 de Maio de 2011]; Available from: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>.
32. Zhang H, Howard EM, Roepe PD. Analysis of the Antimalarial Drug Resistance Protein PfCRT Expressed in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(51):49767–75.

33. Zhang H, Paguio M, Roepe PD. The Antimalarial Drug Resistance Protein *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Binds Chloroquine. *Biochemistry*. 2004;43:8290-6.
34. Patel V, Booker M, Kramer M, Ross L, Celatka CA, Kennedy LM, et al. Identification and Characterization of Small Molecule Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(50):35078–85.
35. Dittrich S, Alifrangis M, Stohrer JM, Thongpaseuth V, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, et al. Falciparum malaria in the north of Laos: the occurrence and implications of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr) gene haplotype SVMNT. *Tropical Medicine and International Health*. 2005;10(12):1267–70.
36. Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu ABS, Bray PG, et al. Evidence for a Central Role for PfCRT in Conferring *Plasmodium falciparum* Resistance to Diverse Antimalarial Agents. *Molecular Cell*. 2004;15:867–77.
37. Sá JM, Twua O, Haytona K, Reyesa S, Fayb MP, Ringwaldc P, et al. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106(45):18883–9.
38. Witkowski B, Berry A, Benoit-Vicala F. Resistance to antimalarial compounds: Methods and applications. *Drug Resistance Updates*. 2009;12:42-50.
39. Djimdé A, Doumbo O, Cortese J, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344(4):257-63.
40. Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance. *Journal of Cell Science*. 2006;119:1016-25.
41. Lehane A, Hayward R, Saliba K, Kirk K. A verapamil-sensitive chloroquine-associated H⁺ leak from the digestive vacuole in chloroquine-resistant malaria parasites. *Journal of Cell Science*. 2008;121:1624-32.
42. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000;403:906–9.
43. Picot S, Olliaro P, Monbrison Fd, Bienvenu A-L, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malaria Journal*. 2009;8(89).
44. Folarina OA, Bustamanteb C, Gbotoshoa GO, Sowunmia A, Zalis MG, Oduolac AMJ, et al. In vitro amodiaquine resistance and its association with mutations in pfcr and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria. *Acta Tropica*. 2011;120:224–30.
45. Rason MA, Andrianantenaina HB, Arie F, Raveloson A, Domarle O, Randrianarivelosia M. Prevalent pfmdr1 n86y mutant *Plasmodium falciparum* in

Madagascar despite absence of pfcr1 mutant strains. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2007;76:1079-83.

46. Wisedpanichkij R, Chaijaroenkula W, Sangsuwanb P, Tantisawat J, Boonpraserta K, Na-Bangchanga K. In vitro antimalarial interactions between mefloquine and cytochrome P450 inhibitors. Acta Tropica. 2009;112:12-5.

47. Jeffress M, Fields S. Identification of putative *Plasmodium falciparum* mefloquine resistance genes. Molecular & Biochemical Parasitology. 2005;139:133–9.

48. Rodrigues T, Lopes F, Moreira R. Inhibitors of the Mitochondrial Electron Transport Chain and de novo Pyrimidine Biosynthesis as Antimalarials: The Present Status. Current Medicinal Chemistry. 2010;17:929-56.

49. Bhattacharjee A, Kyle D, Vennerstrom J, Milhous W. A 3D QSAR Pharmacophore Model and Quantum Chemical Structure-Activity Analysis of Chloroquine(CQ)-Resistance Reversal. Journal of Chemical Information and Modeling. 2002;42:1212-20.

50. Andrews S, Burgess S, Skaalrud D, Kelly J, Peyton D. Reversal Agent and Linker Variants of Reversed Chloroquinones: Activities against *Plasmodium falciparum*. Journal of Medicinal Chemistry. 2010;53:916-9.

51. Masseno V, Muriithi S, Nzila A. In Vitro Chemosensitization of Plasmodium falciparum to Antimalarials by Verapamil and Probenecid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53(7):3131–4.

52. Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. Mutations in pfmdr1 Modulate the Sensitivity of Plasmodium falciparum to the Intrinsic Antiplasmodial Activity of Verapamil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005;49(2):840–2

53. Nwankwo J. Significant transcriptional down-regulation of the human MDR1 gene by b-naphthoflavone: A proposed hypothesis linking potent CYP gene induction to MDR1 inhibition. Medical Hypotheses. 2007;68:661-9.

54. Sowunmi A, Fehintola F, Adediji A, Gbotosho G, Falade C, Tambo E, et al. Open randomized study of pyrimethamine-sulphadoxine vs. pyrimethamine-sulphadoxine plus probenecid for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children. Tropical Medicine & International Health. 2004;9:606-14.

55. Latha K, Ruckmani A. Effect of “Verapamil” in Malaria - A Prospective Randomized Double Blind Control Clinical Study. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2010;4:2707-13.

56. Guan J, Kyle D, Gerena L, Zhang Q, Milhous W, Lin A. Design, Synthesis, and Evaluation of New Chemosensitizers in Multi-Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. Journal of Medicinal Chemistry. 2002;45:2741-8.

57. Burgess S, Selzer A, Kelly J, Smilkstein M, MK MR, Peyton D. A Chloroquine-like Molecule Designed to Reverse Resistance in *Plasmodium falciparum*. Journal of Medicinal Chemistry. 2006;49:5623-5.

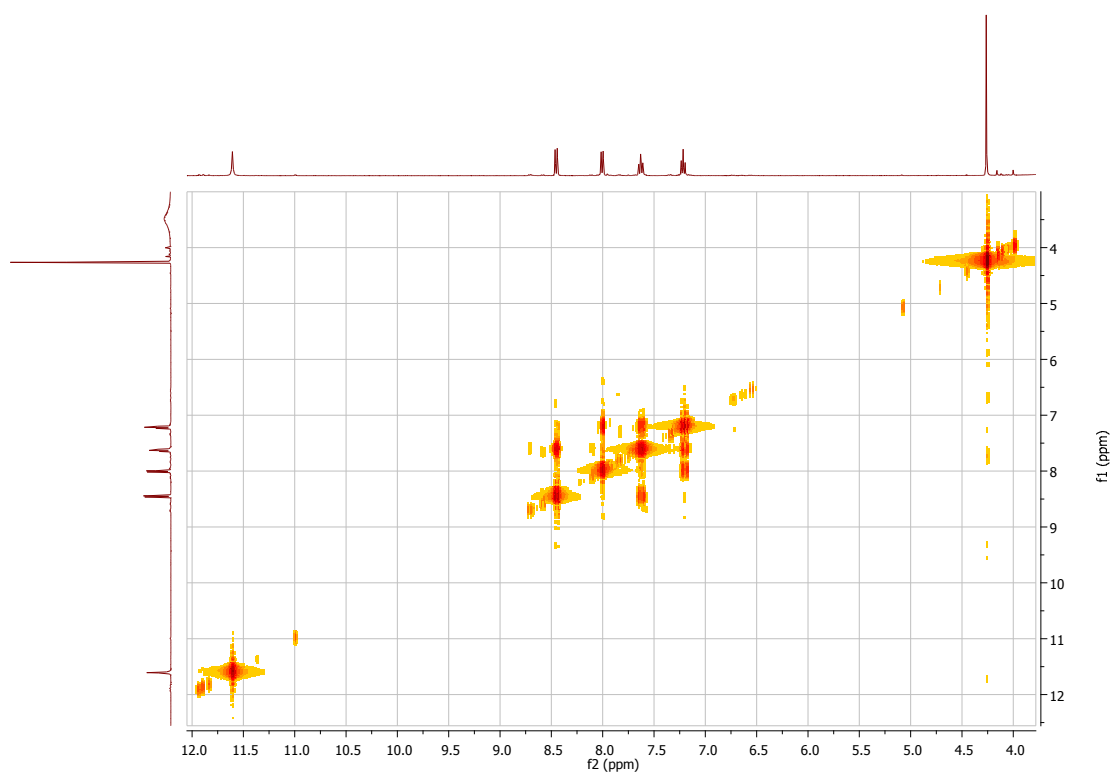
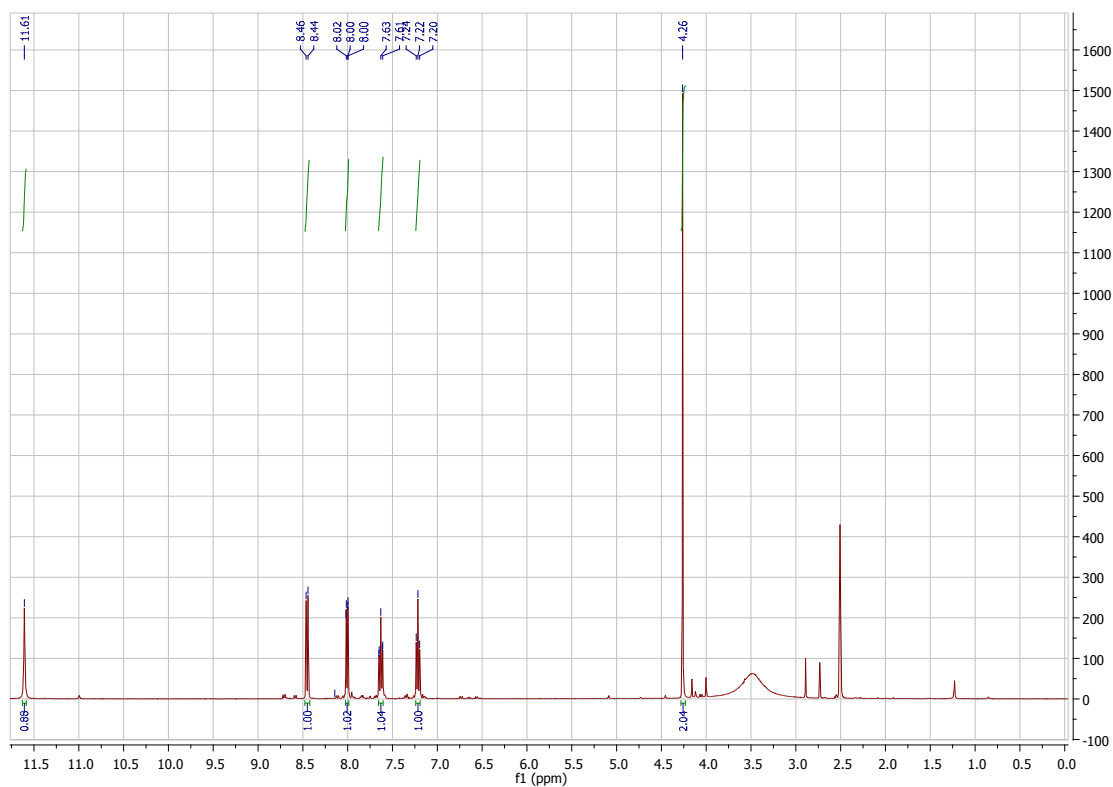
58. Kelly J, Smilkstein M, Cooper R, Lane K, Johnson R, Janowsky A, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of 10-N-Substituted Acridones as Novel Chemosensitizers in *Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007;51(11):4133-40.

59. Frederich M, Tits M, Angenot L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102:11-9.
60. Mardenborough LG, Zhu XY, Fan P, Jacob MR, Khan SI, Walker LA, et al. Identification of bis-quindolines as new anti-infective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005;13:3955–63.
61. Kumar EVKS, Ablordeppey JREaSY. Indolo[3,2-*b*]quinolines: Synthesis, Biological Evaluation and Structure Activity-Relationships. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008;8:538-54.
62. Lavrado J, Moreira R, Paulo A. Synthetic strategies towards bioactive indolo[3,2-*b*]quinolines. In: Carreiras MdC, Marco-Contelles J, editors. *Heterocyclic Targets in Advanced Organic Synthesis*. Kerala, India: Research Signpost; 2011. p. 109-24.
63. Jang DS, Park EJ, Kang Y-H, Su B-N, Hawthorne ME, Vigo JS, et al. Compounds Obtained from *Sida acuta* with the Potential to Induce Quinone Reductase and to Inhibit 7,12-Dimethylbenz-[a]anthracene-Induced Preneoplastic Lesions in a Mouse Mammary Organ Culture Model. *Archives of Pharmacal Research*. 2003;26(8):585-90.
64. Parvatkar PT, Parameswaran PS, Tilve SG. Isolation, biological activities and synthesis of indoloquinoline Alkaloids: cryptolepine, isocryptolepine and neocryptolepine. *Currents Organic Chemistry*. 2011;15(7):1036-57.
65. Bierer D, Dubenko L, Zhang P, Lu Q, Imbach P, Garofalo A, et al. Antihyperglycemic activities of cryptolepine analogues: an ethnobotanical lead structure isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998;41:2754–64.
66. Lavrado J, Cabal G, Prudêncio M, Mota M, Gut J, Rosenthal P, et al. Incorporation of Basic Side Chains into Cryptolepine Scaffold: Structure-Antimalarial Activity Relationships and Mechanistic Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54:734–50.
67. Chenga Y, Wang J, Meth-Cohn O. The regioselective hydrolysis or hydrolytic oxidation of indolo[3,2-*b*]quinolinium salts: a new synthetic approach to substituted indolo[3,2-*b*]quinolinones. *ARKIVOC*. 2005;xiii:89-97.
68. Karou SD, Nadembega WM, Ilboudo DP, Ouermi D, Gbeassor M, Souza CD, et al. *Sida acuta* Burm. f.: a medicinal plant with numerous potencies. *African Journal of Biotechnology*. 2007;6(25):2953-9.
69. Lavrado J, Moreira R, Paulo A. Indoloquinolines as Scaffolds for Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17:2348-70.
70. Wright CW, Addae-Kyereme J, Breen AG, Brown JE, Cox MF, Croft SL, et al. Synthesis and Evaluation of Cryptolepine Analogues for Their Potential as New Antimalarial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001;44:3187-94.
71. Lavrado J, Paulo A, Gut J, Rosenthal PJ, Moreira R. Cryptolepine analogues containing basic aminoalkyl side-chains at C-11: Synthesis, antiplasmodial activity, and cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18:1378–81.

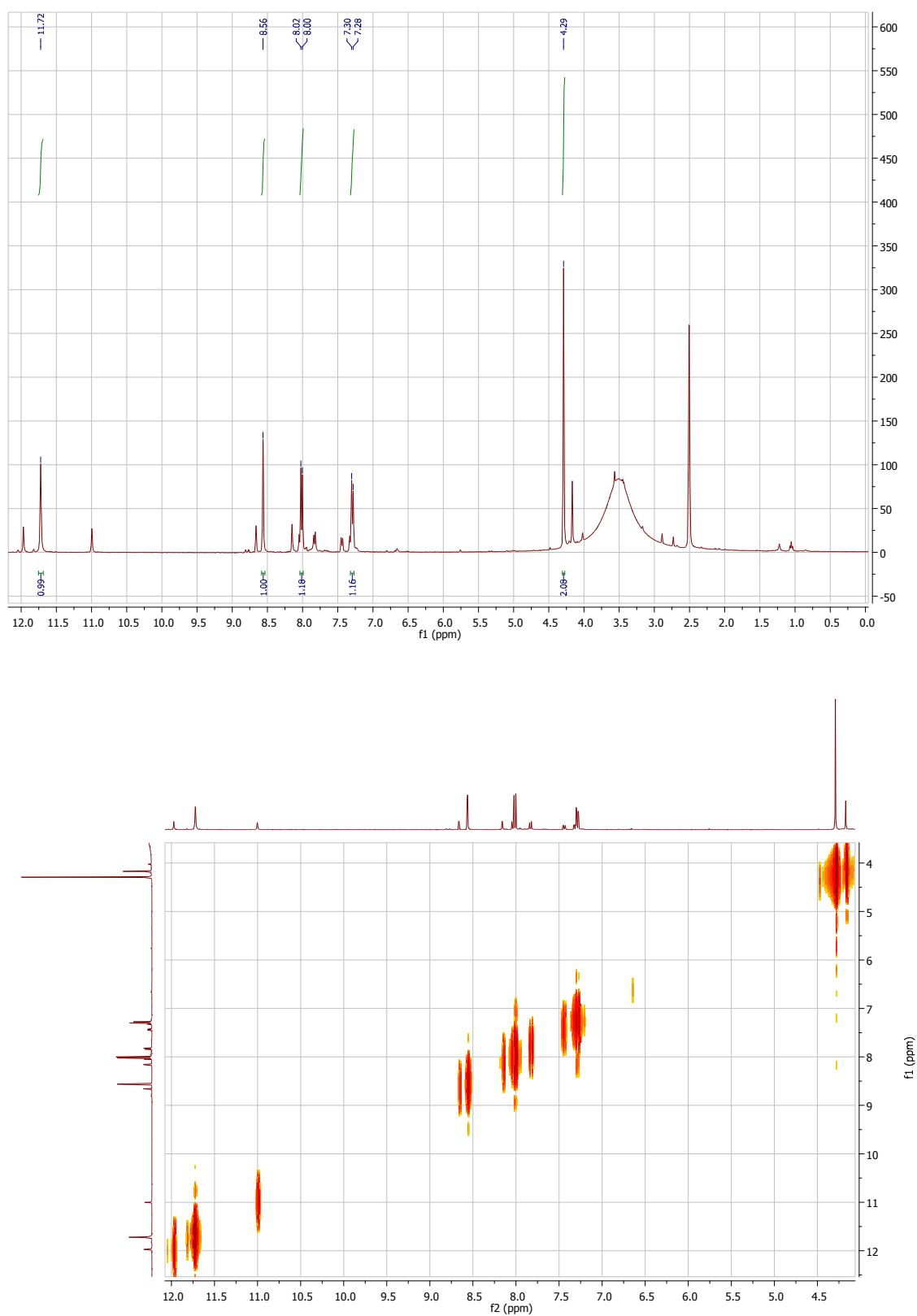
72. Onyeibor O, Croft SL, Dodson HI, Feiz-Haddad M, Kendrick H, Millington NJ, et al. Synthesis of Some Cryptolepine Analogues, Assessment of Their Antimalarial and Cytotoxic Activities, and Consideration of Their Antimalarial Mode of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;48:2701-9.
73. Lavrado J. Novel C11 Amino Derivatives of Cryptolepine: Synthesis and in vitro studies with DNA and haeme. Tese de Doutoramento. Lisboa: Universidade de Lisboa Faculdade de Farmácia; 2010.
74. Gorlitzer K, Weber J. Fused Quinolines 5. 10-Hydroxy-10H-Indolo[3,2-b]Quinoline 5-Oxide (Dioxyquindoline). *Archiv der Pharmazie*. 1981;314:850-2.
75. Gorlitzer K, Weber J. Fused Quinolines 6. 10H-Indolo[3,2-b]Quinolines. *Archiv der Pharmazie*. 1981;314:852-61.
76. Wan SB, Liu ZL, Chen D, Dou QP, Jiang T. Polyphosphorous acid catalyzed cyclization in the synthesis of cryptolepine derivatives. *Chinese Chemical Letters*. 2007;18:1179–81.
77. Liu H, Zhang L. Microwave Heating in Organic Synthesis and Drug Discovery. In: Chandra U, editor. *Microwave dielectric heating in modern organic synthesis and drug discovery 2011*. p. 351-70.
78. Ramalheite C, Lopes D, Mulhovo S, Molnár J, Rosário V, Ferreira M. New antimalarials with a triterpenic scaffold from *Momordica balsamina*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010;18(14):5254-60.
79. Madureira MDCD, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Cunha APD, Rosário VD. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;81(1):23-9.
80. Nogueira F, Lopes D, Alves AC, Rosário VEd. *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein (MRP) gene expression under chloroquine and mefloquine challenge. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2008;2(1):10-20.
81. Buller R, Peterson ML, Almarsson Ö, Leiserowitz L. Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design. *Crystal Growth & Design*. 2002;2(6):553–62.
82. Bosman A, Delacollette C, Olumese P, Ridley RG, Rietveld A, Shretta R, et al. The Use of Antimalarial Drugs: Report of an Informal Consultation World Health Organization; 2001 [20 de Maio de 2011]; Available from: http://rbm.who.int/cmc_upload/0/000/014/923/am_toc.htm.
83. WHO. In Vitro Micro-Test (MARK III) for the Assessment of the Response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine, Mefloquine, Quinine, Amodiaquine, Sulfadoxine/Pyrimethamine and Artemisinin. 2001:1-22.
84. Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193(4254):673-5.

Anexos

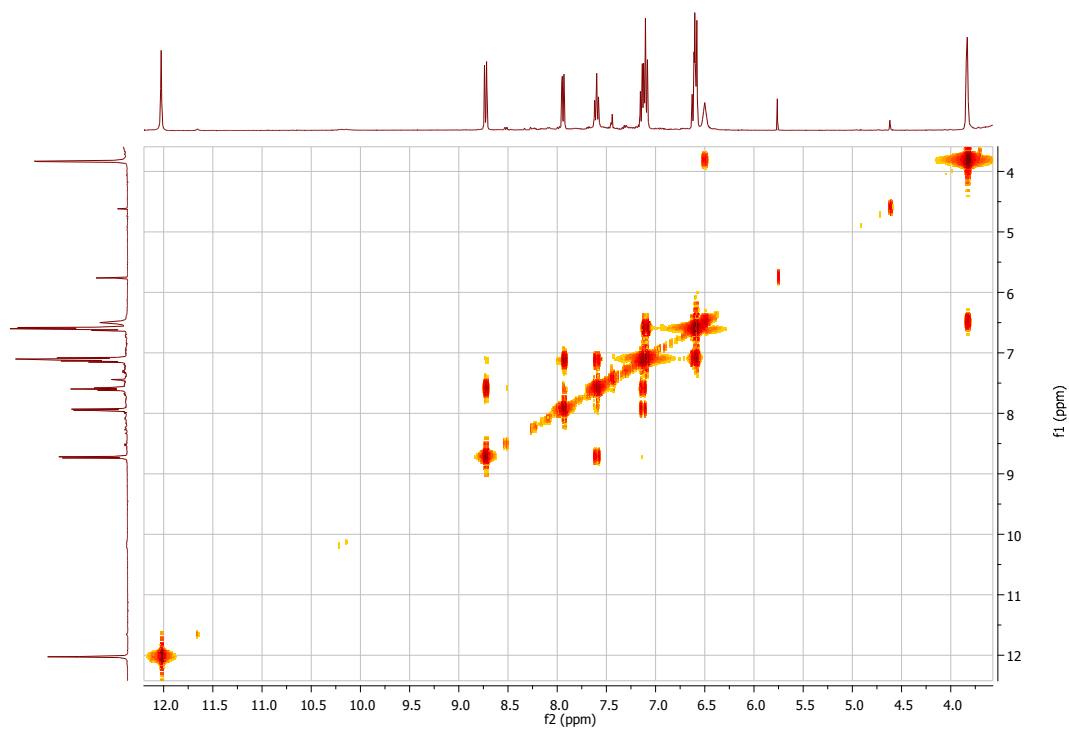
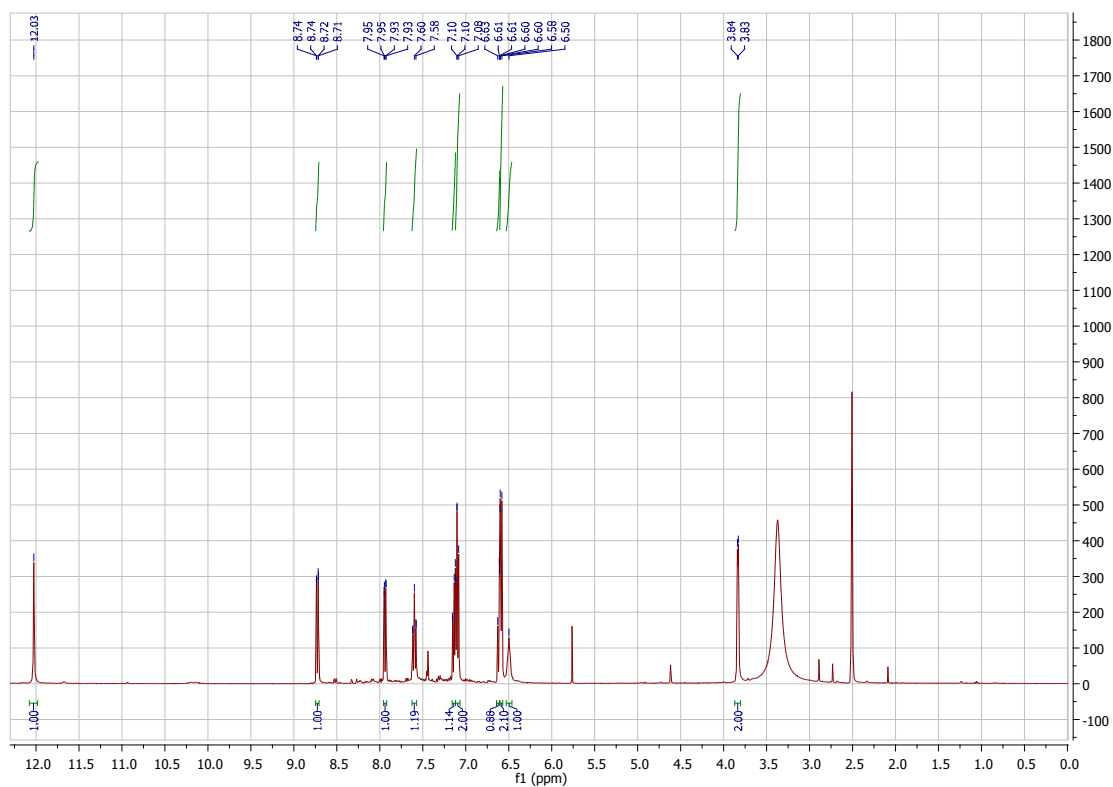
Anexo I. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-bromoacetamido) benzóico (65)



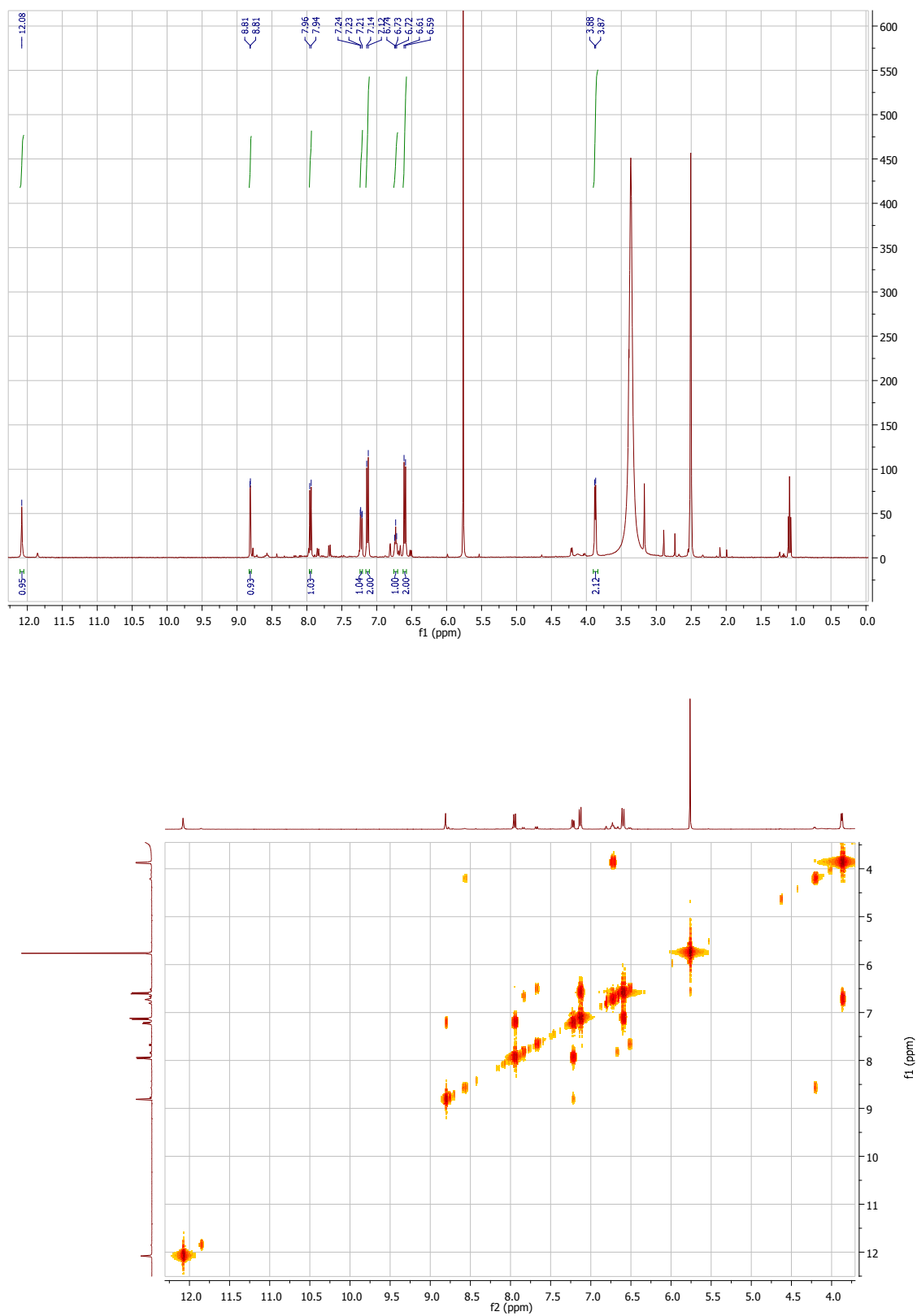
Anexo II. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-bromoacetamido)-4-clorobenzóico (66)



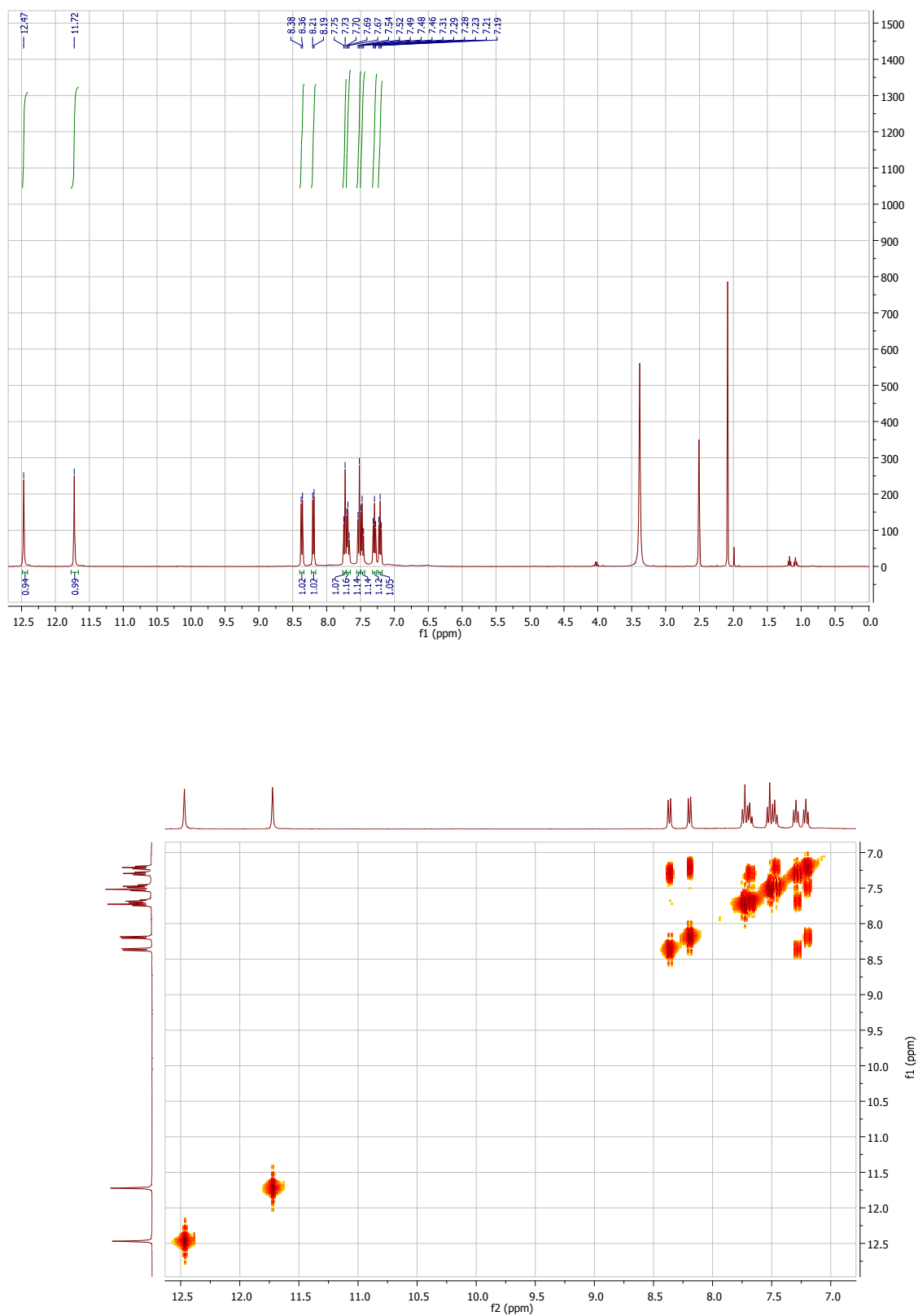
Anexo III. RMN de Protão e COSY do Ácido 2-(2-((fenilamino)acetamido) benzóico (69)



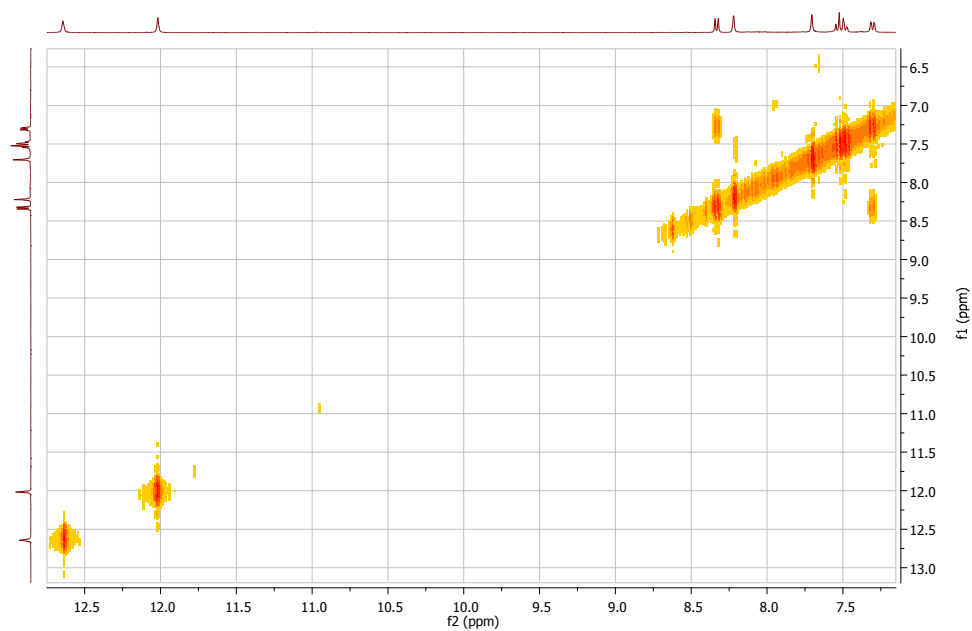
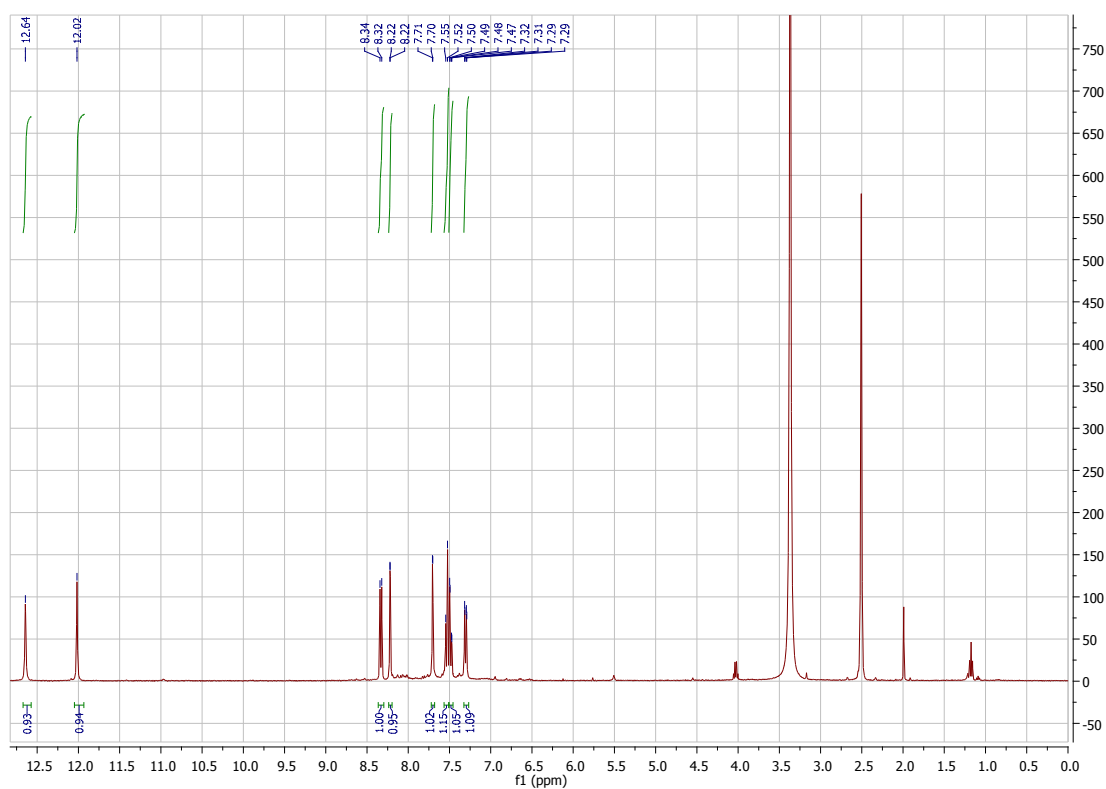
Anexo IV. RMN de Protão e COSY do Ácido 4-cloro-2-{2-[(4-clorofenil)amino]acetamido}benzóico (70)



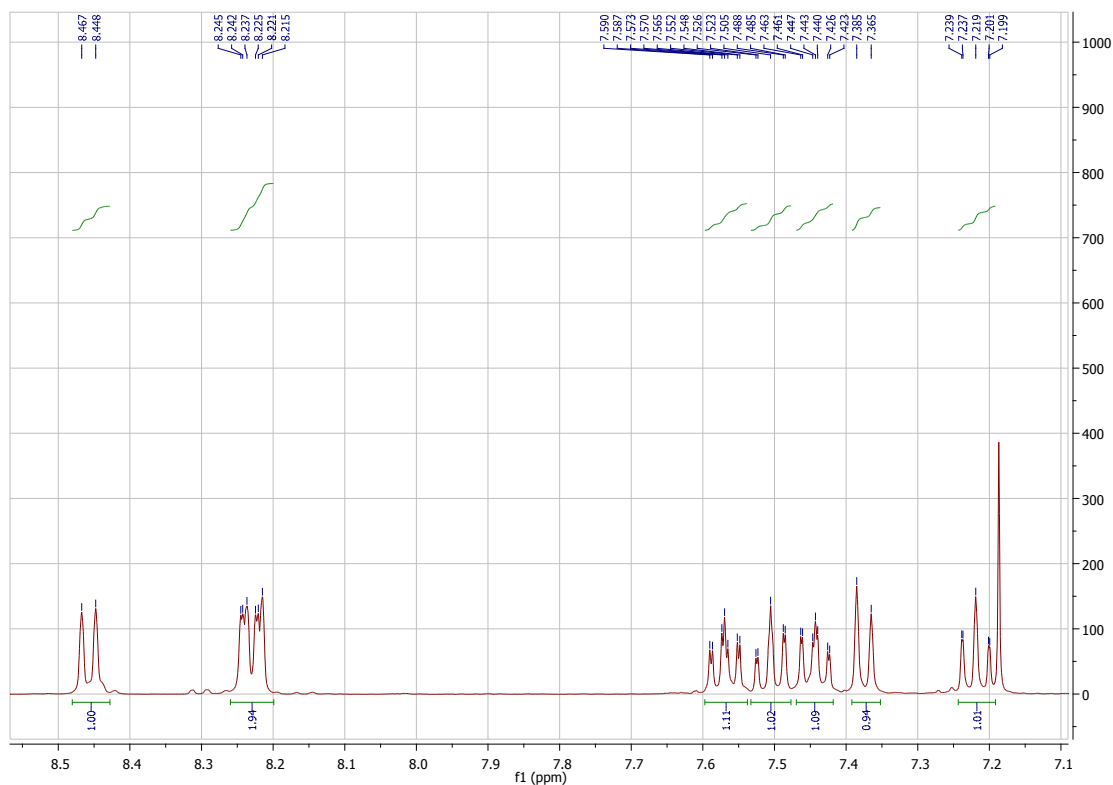
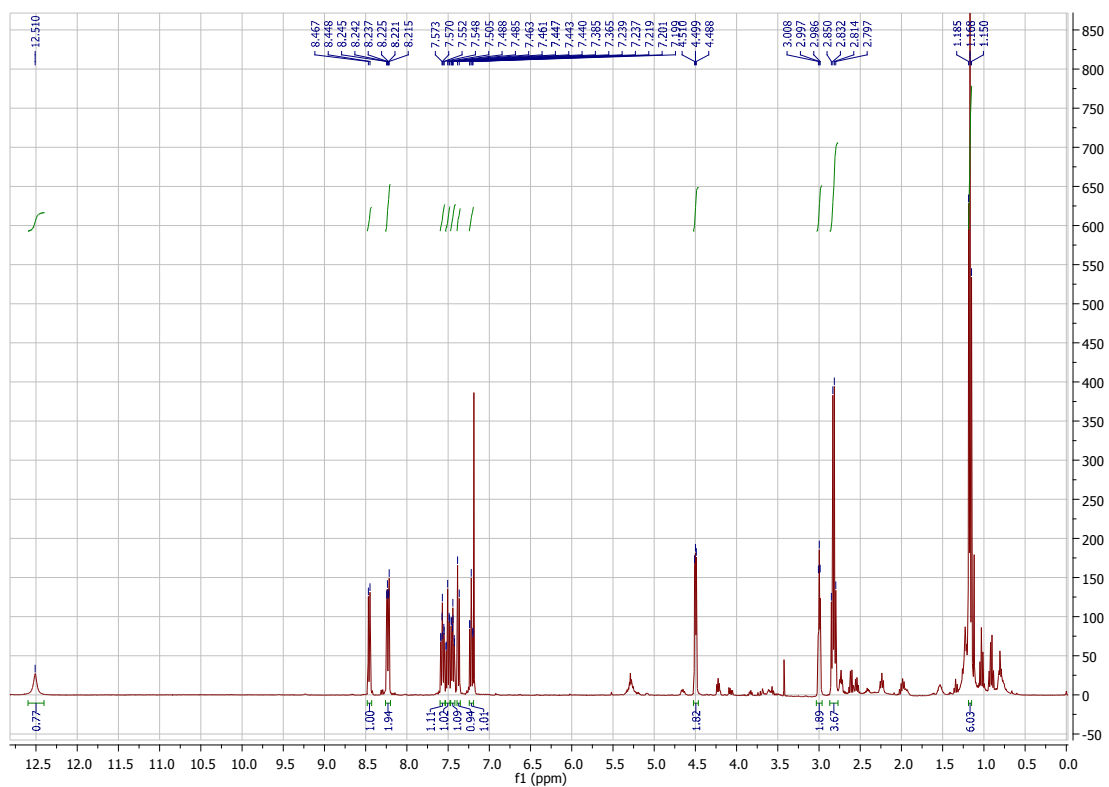
Anexo V. RMN de Protão e COSY da 5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (1)

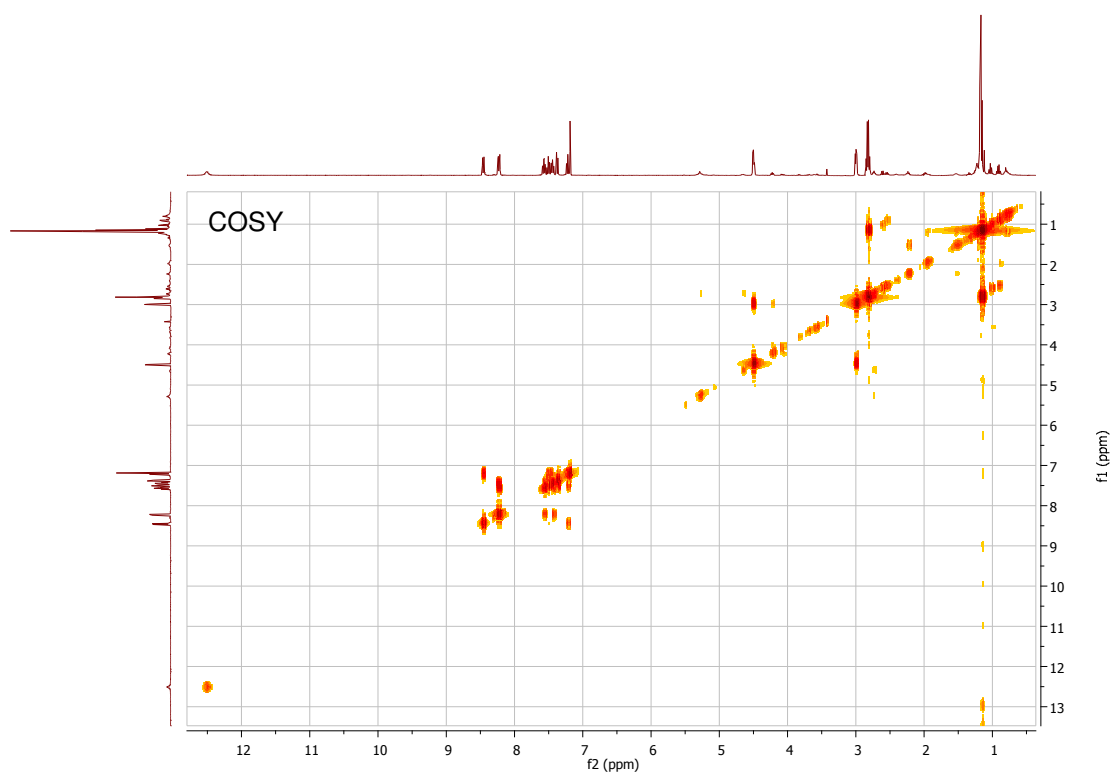
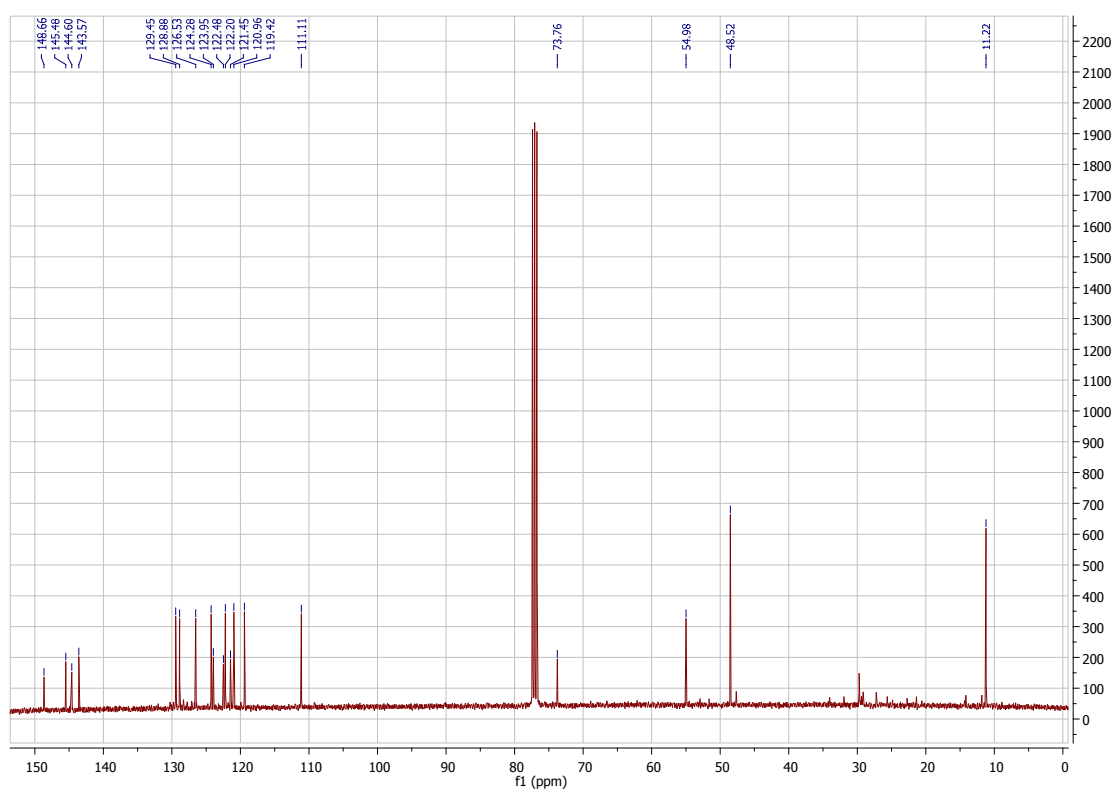


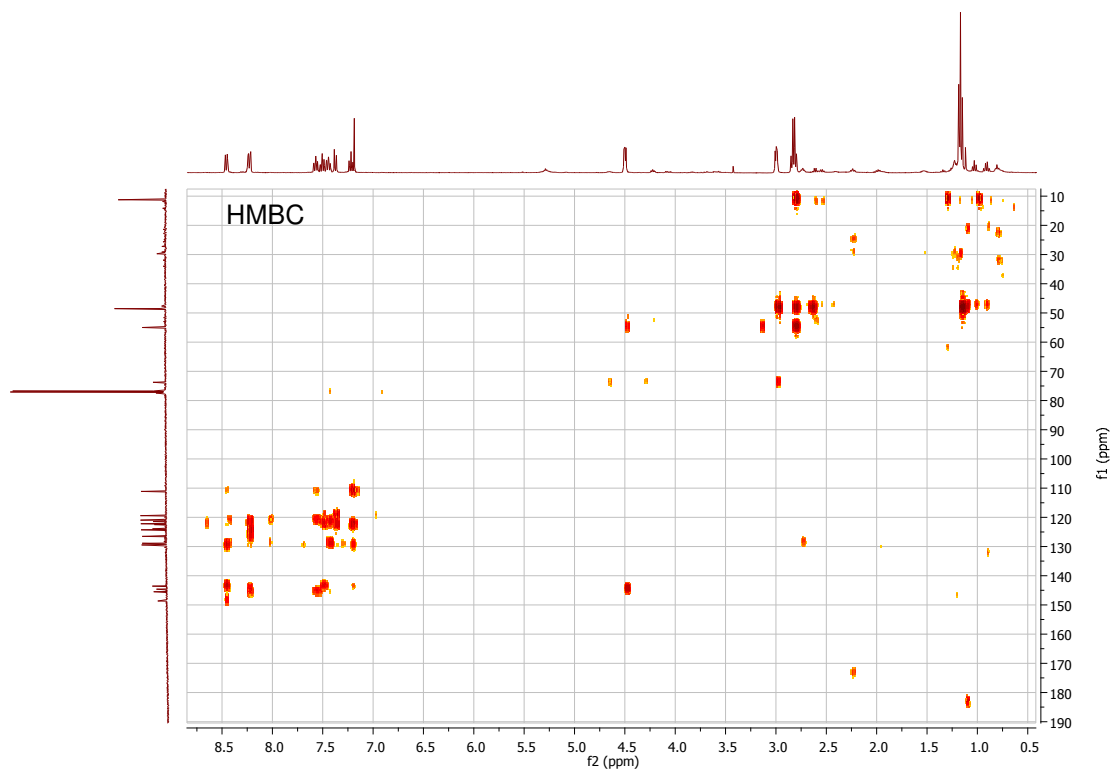
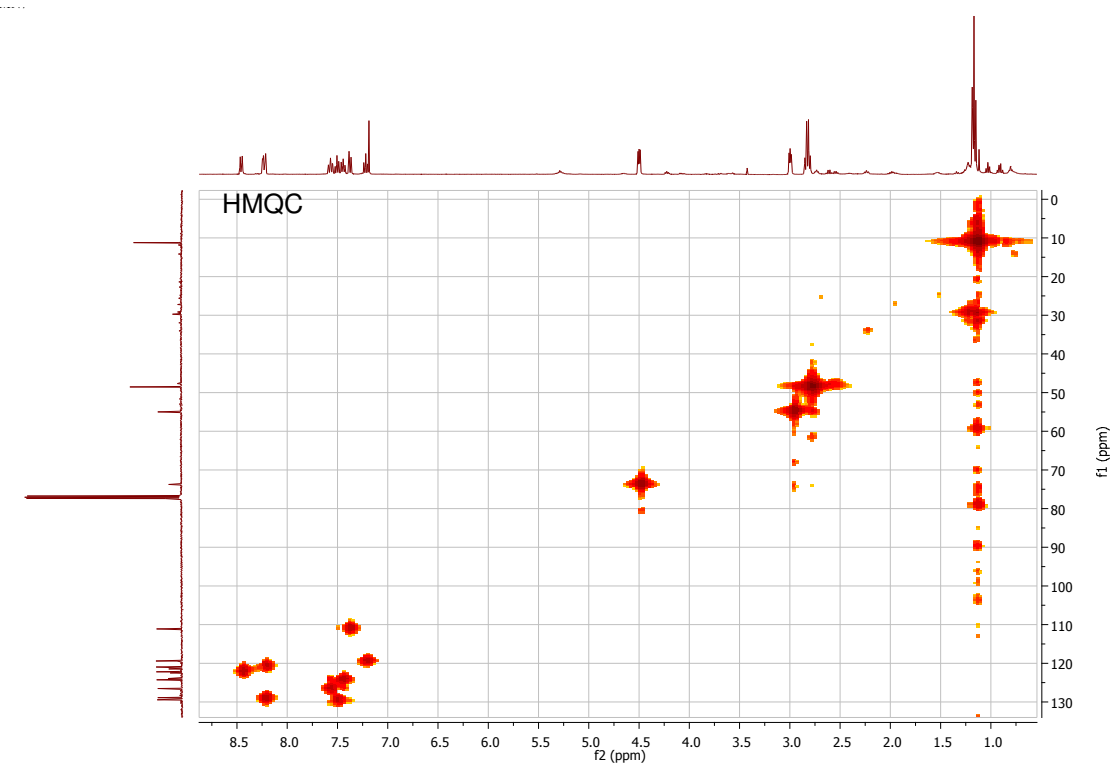
Anexo VI. RMN de Protão e COSY da 3,7-dicloro-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (2)



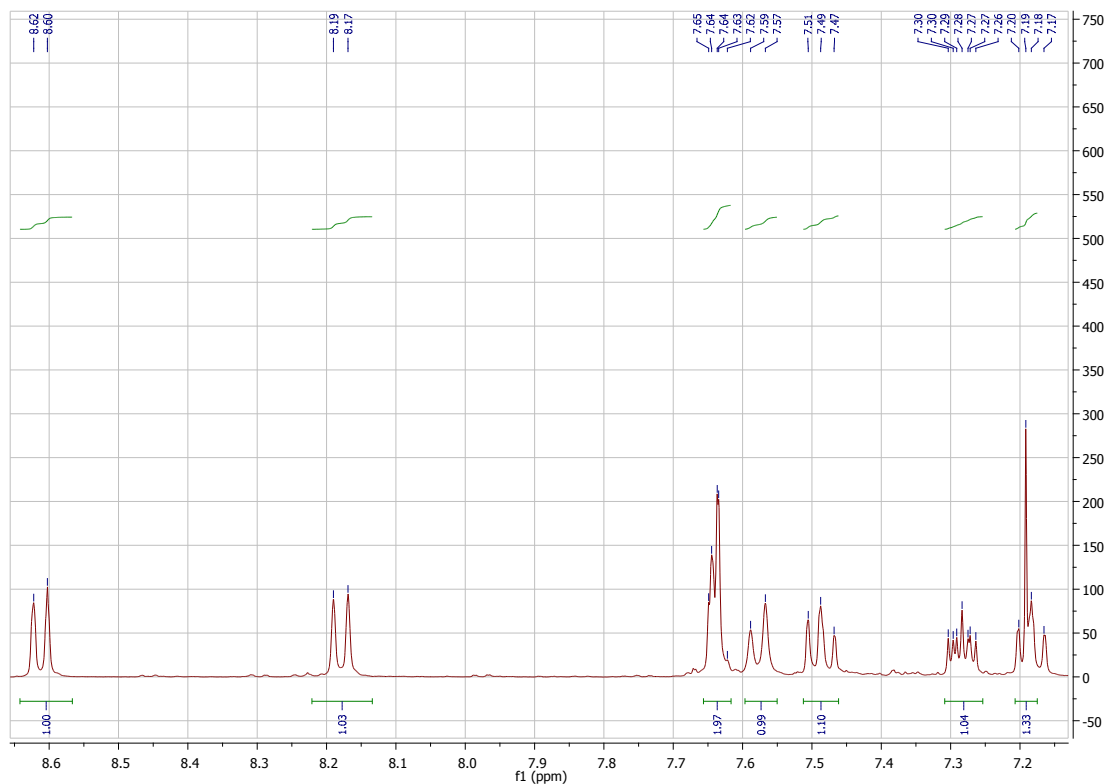
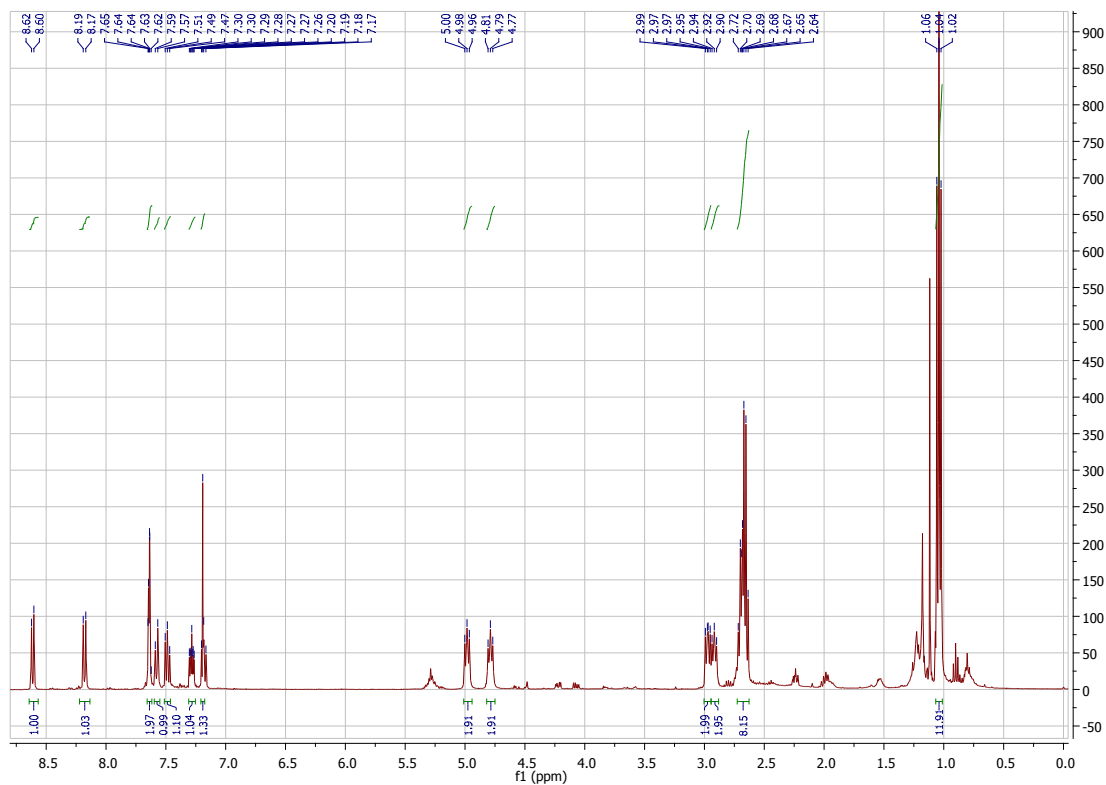
Anexo VII. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 2-[(10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il)oxi]-*N,N*-dietiletanamina (72)

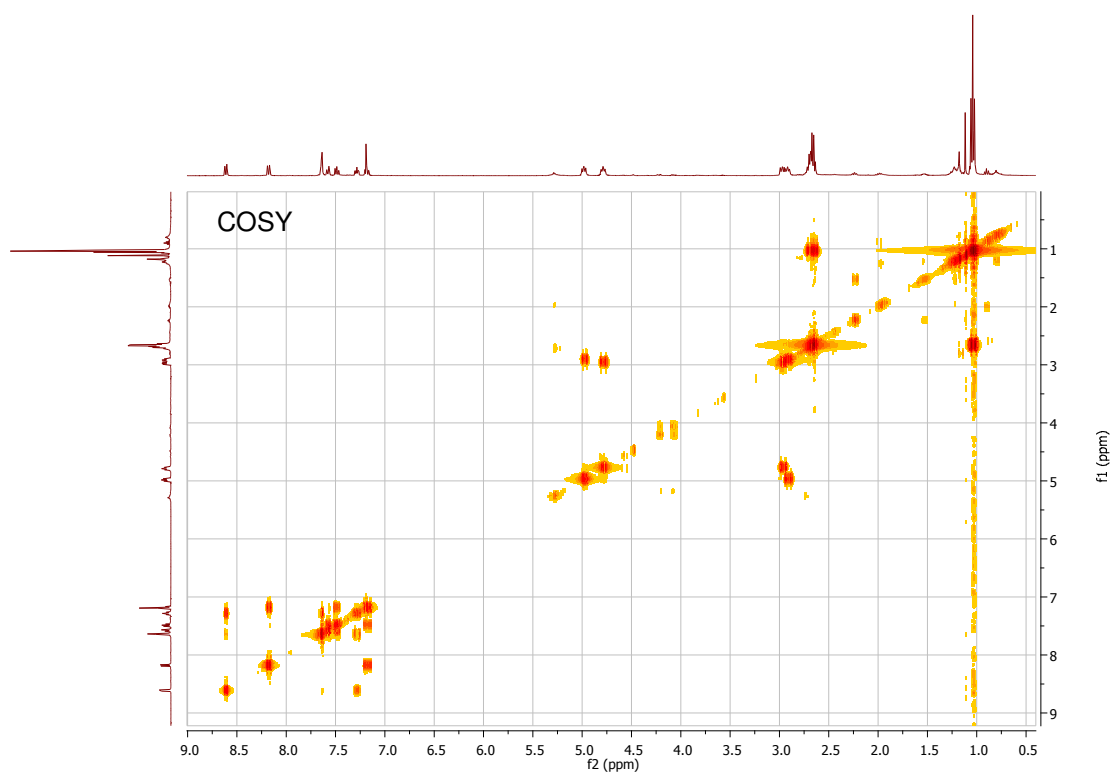
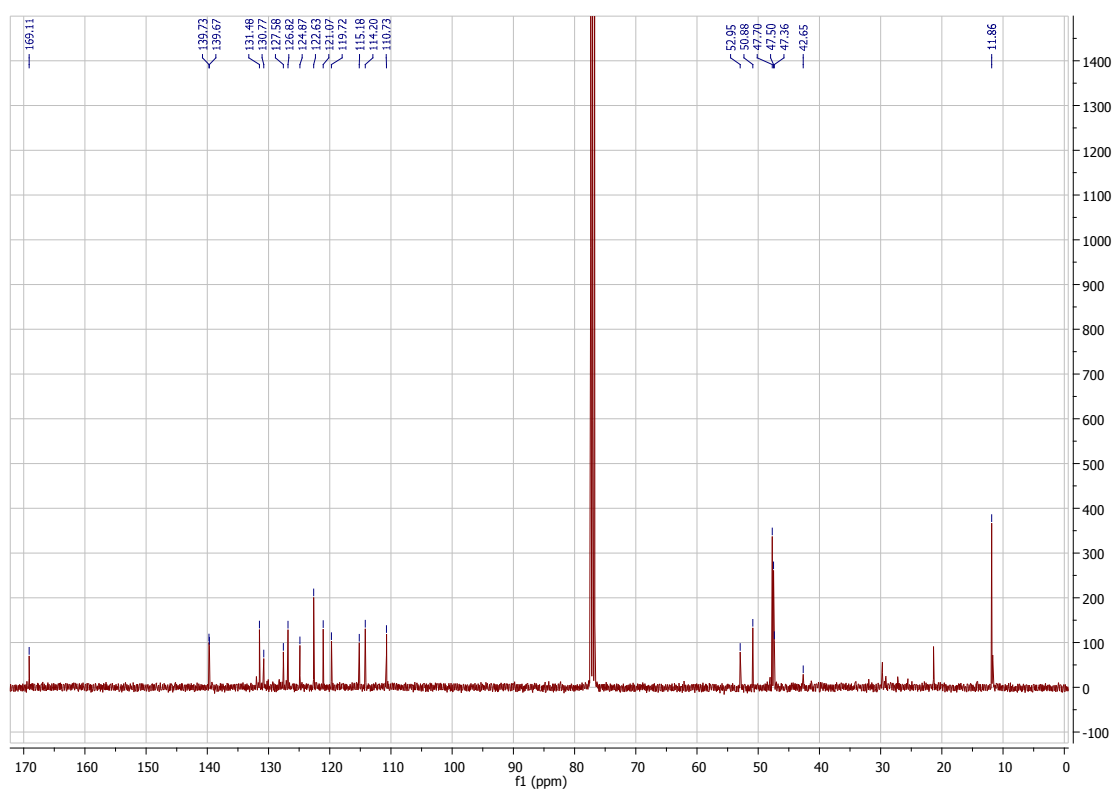


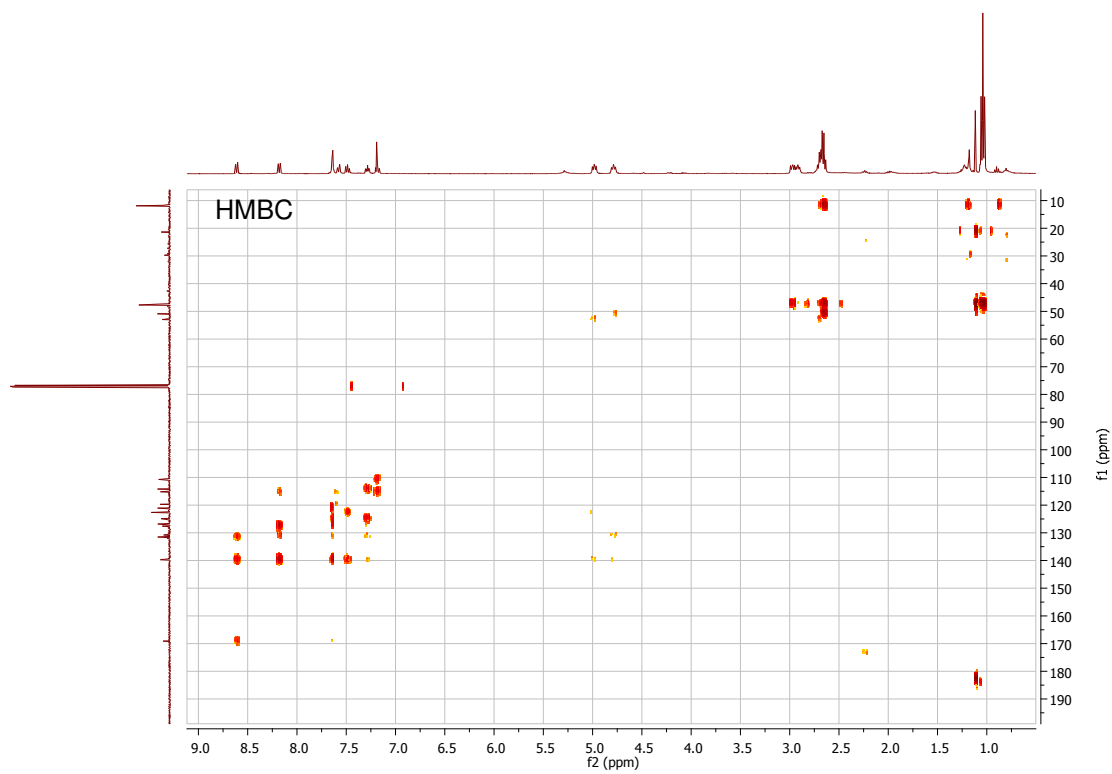
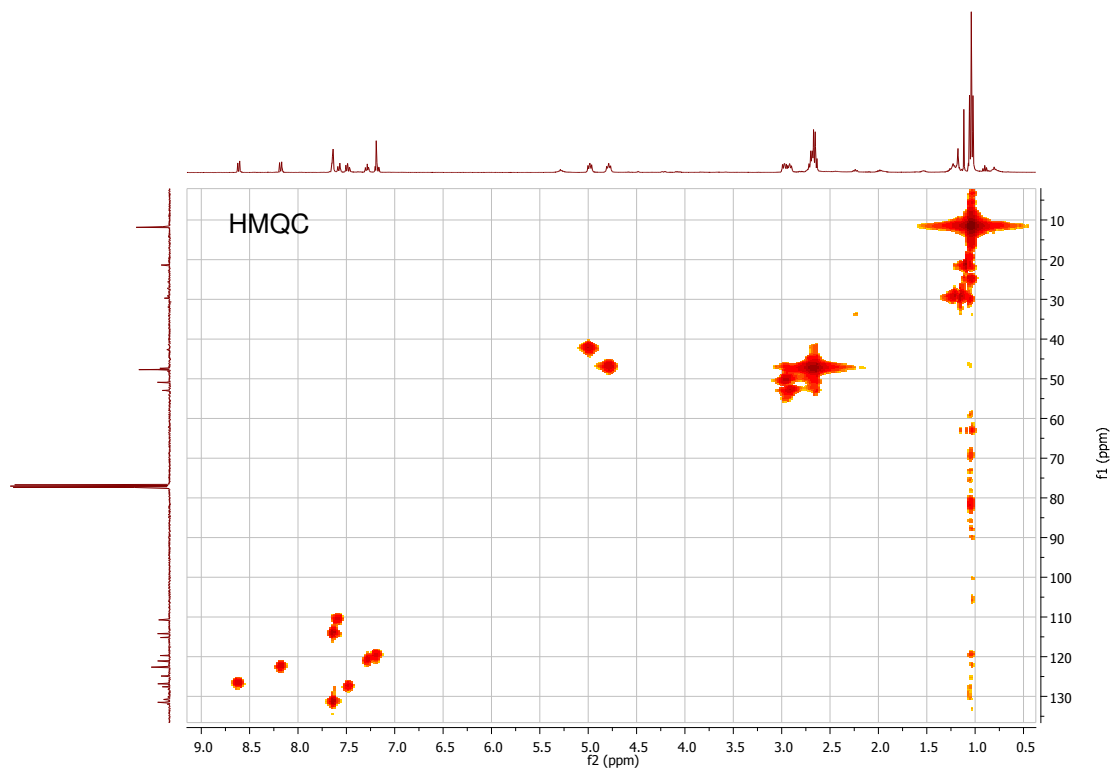




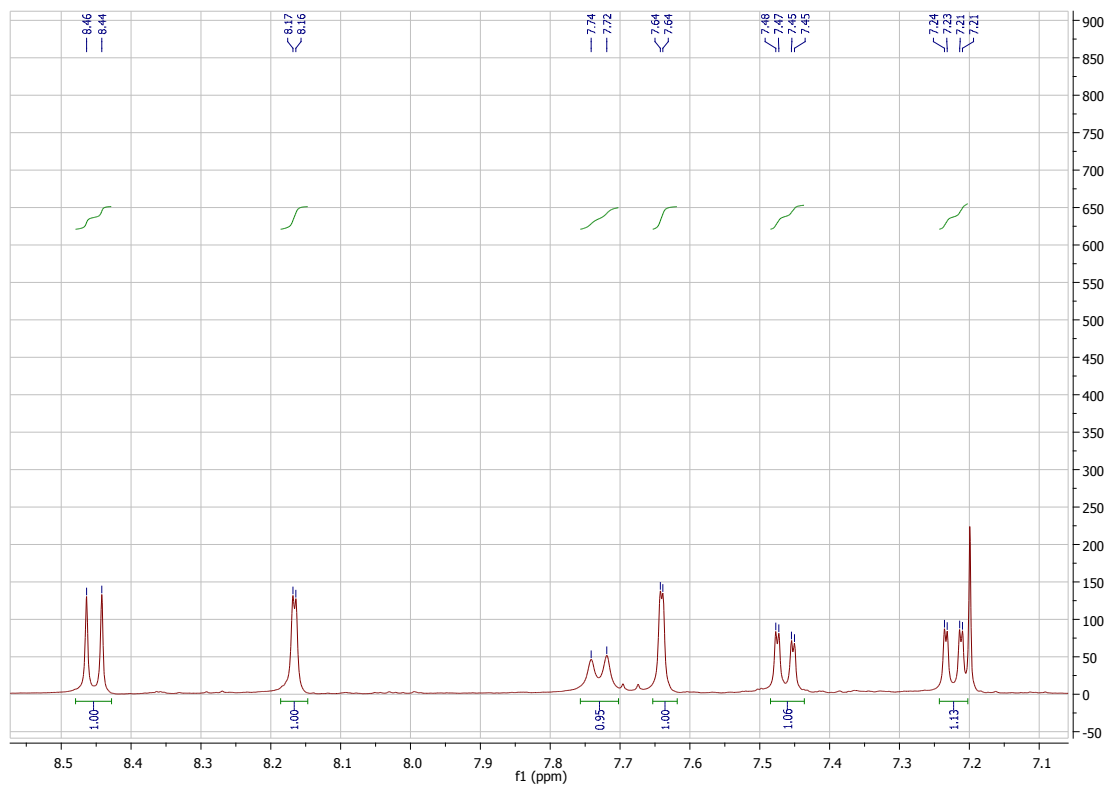
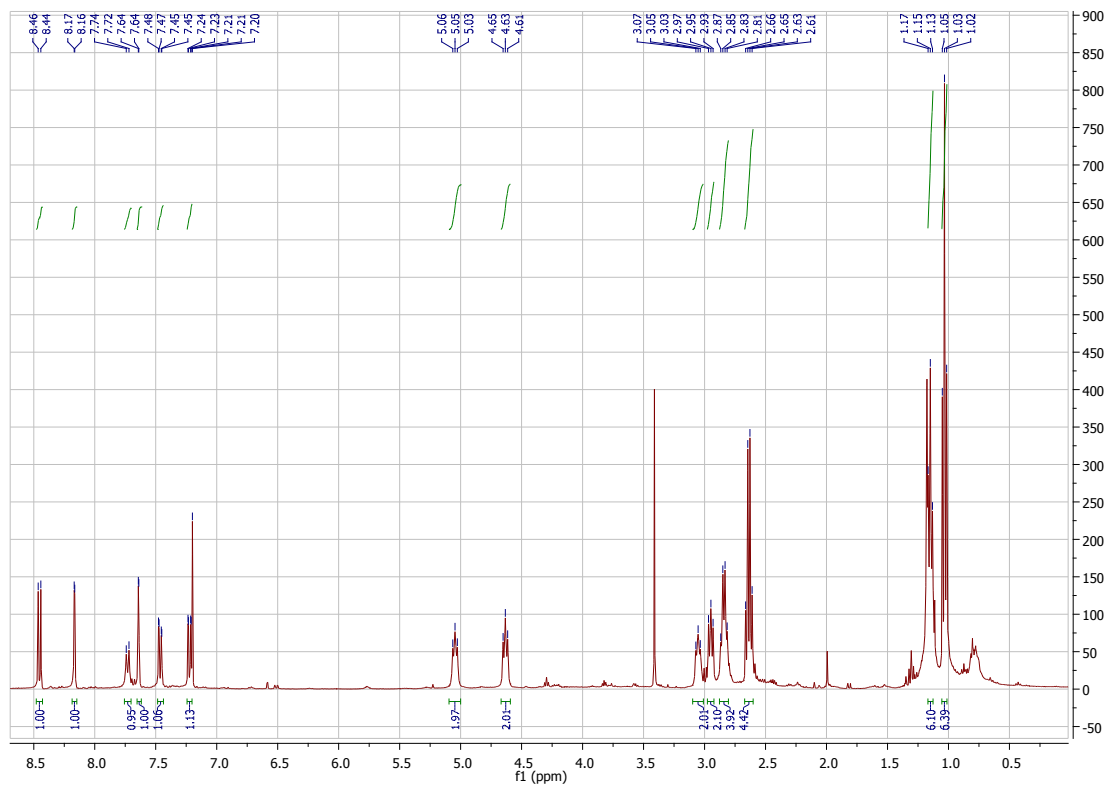
Anexo VIII. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)- ona (74)

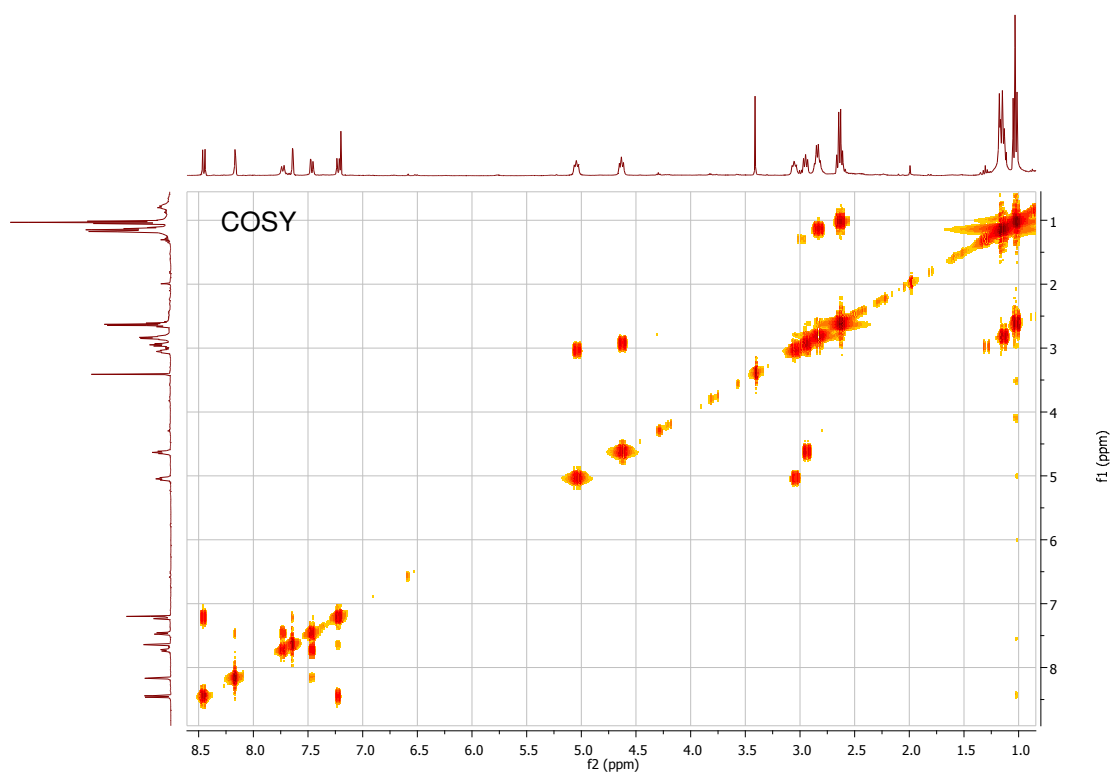
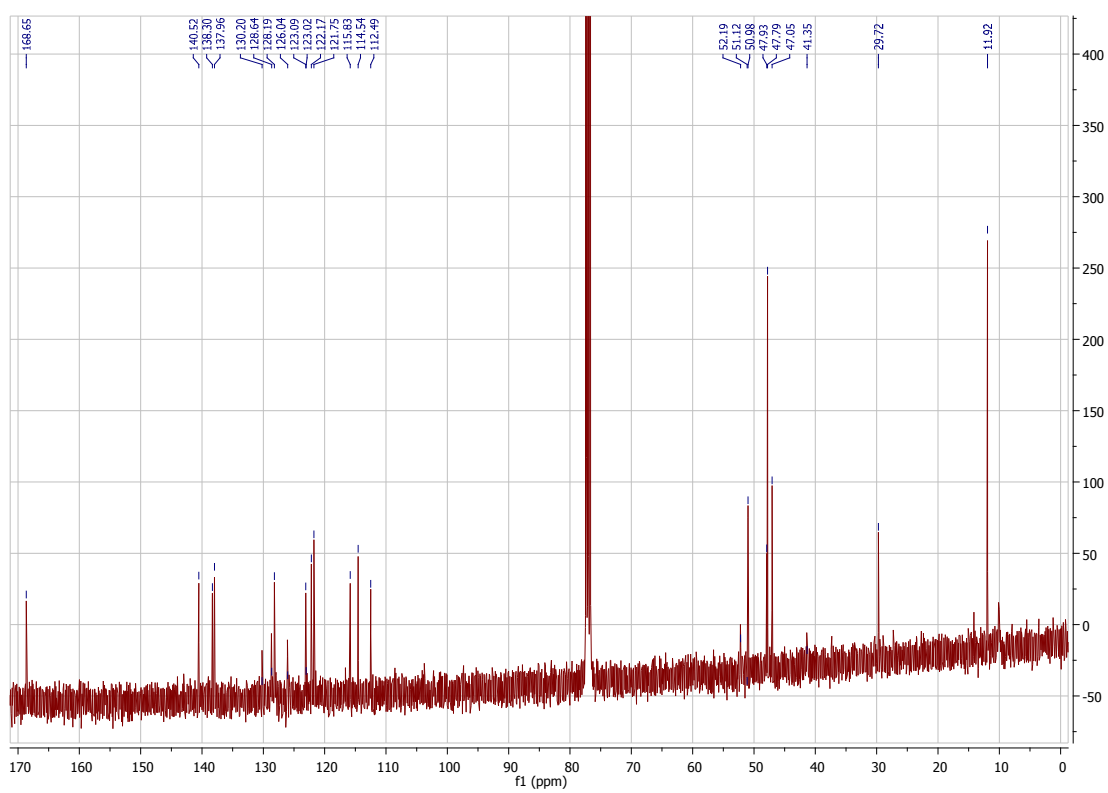


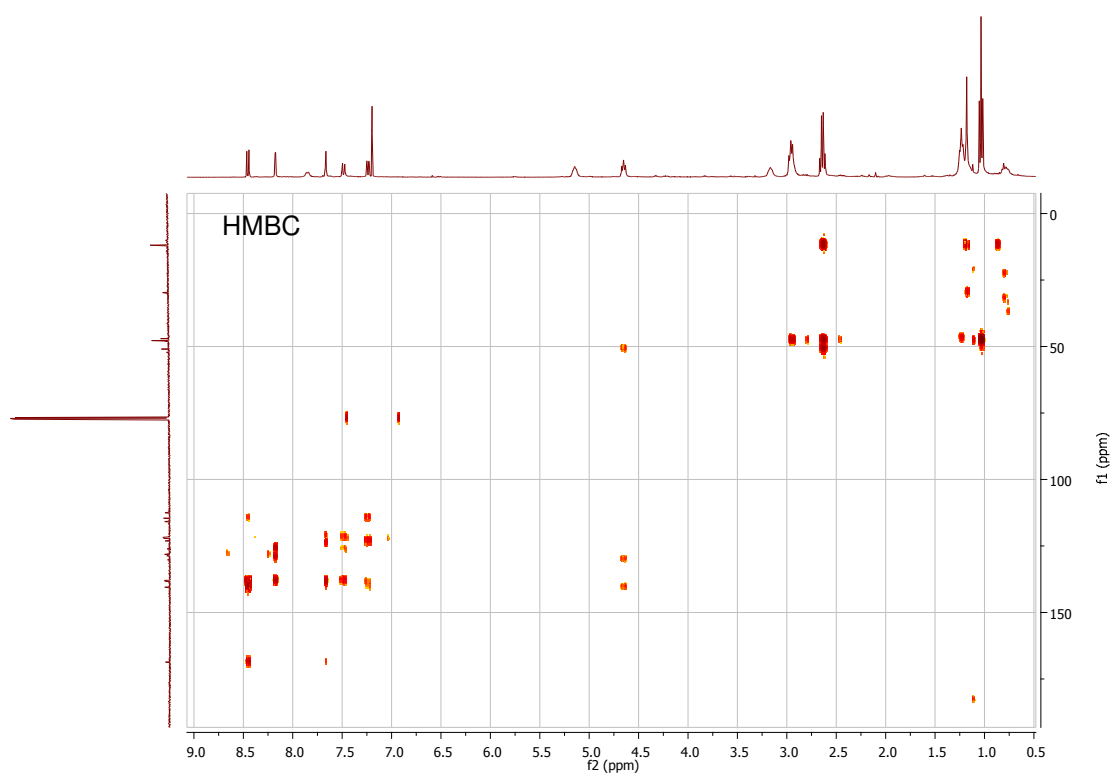
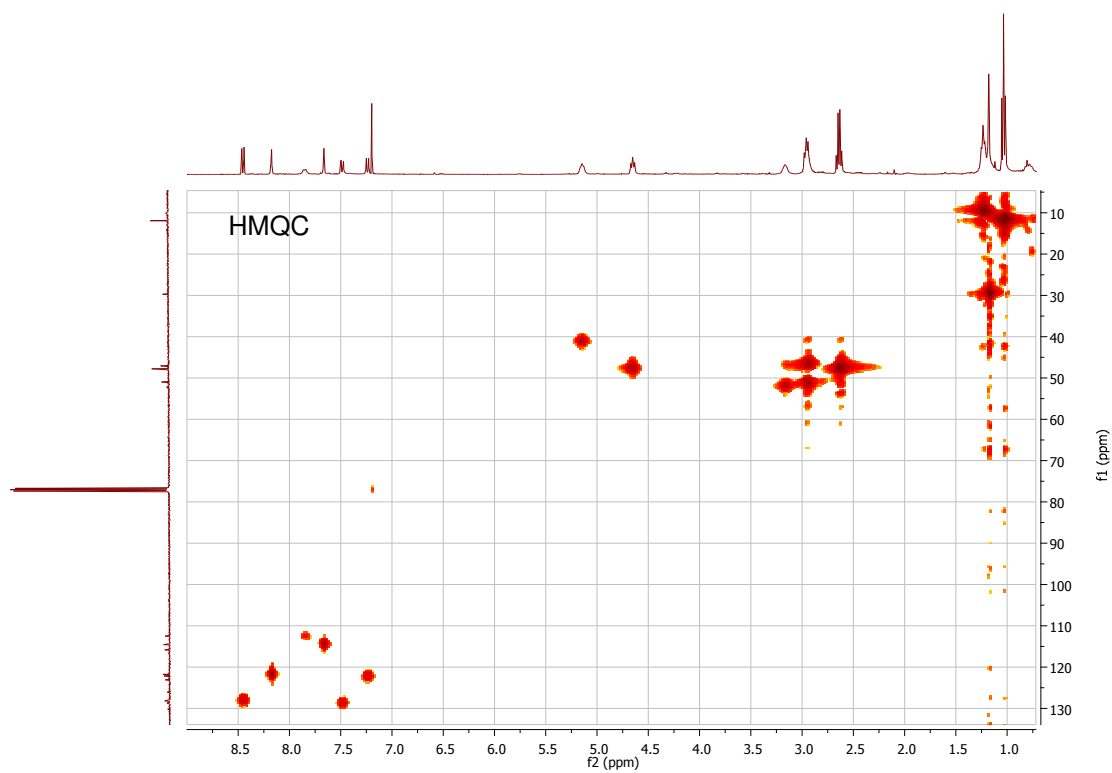




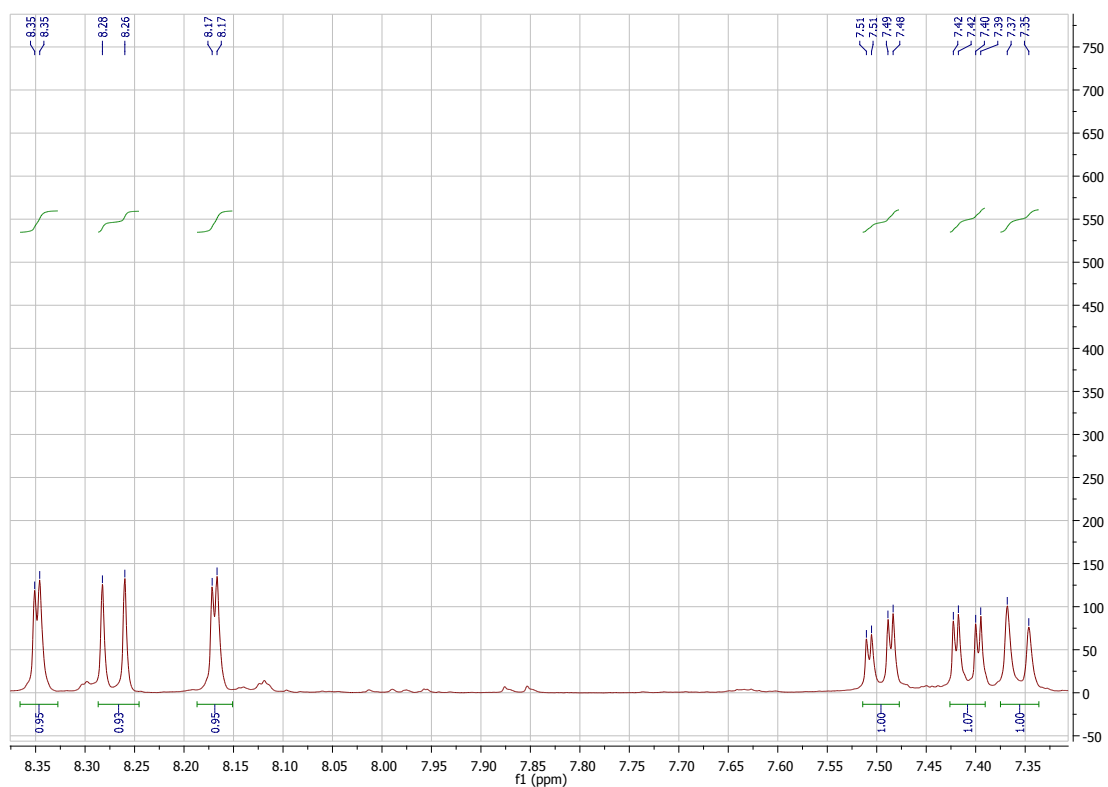
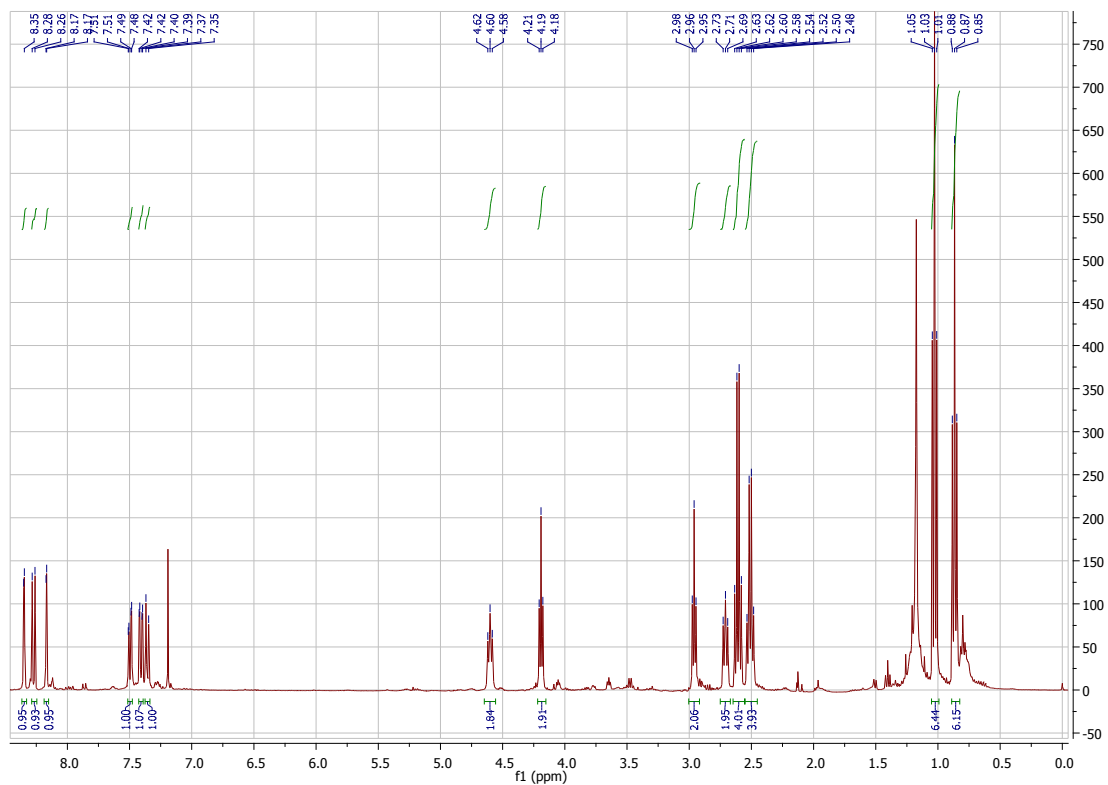
Anexo IX. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC e HMBC da 3,7-dicloro-5,10-bis[2-(dietilamino)etil]-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11(10*H*)-ona (75)

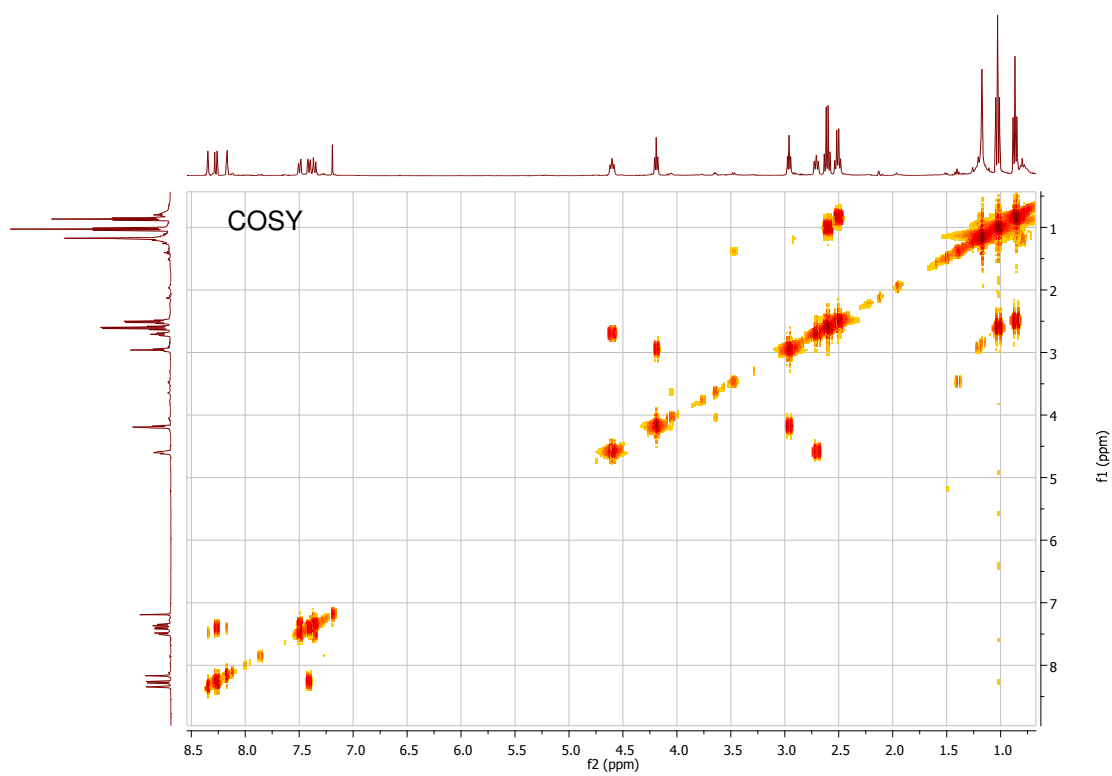
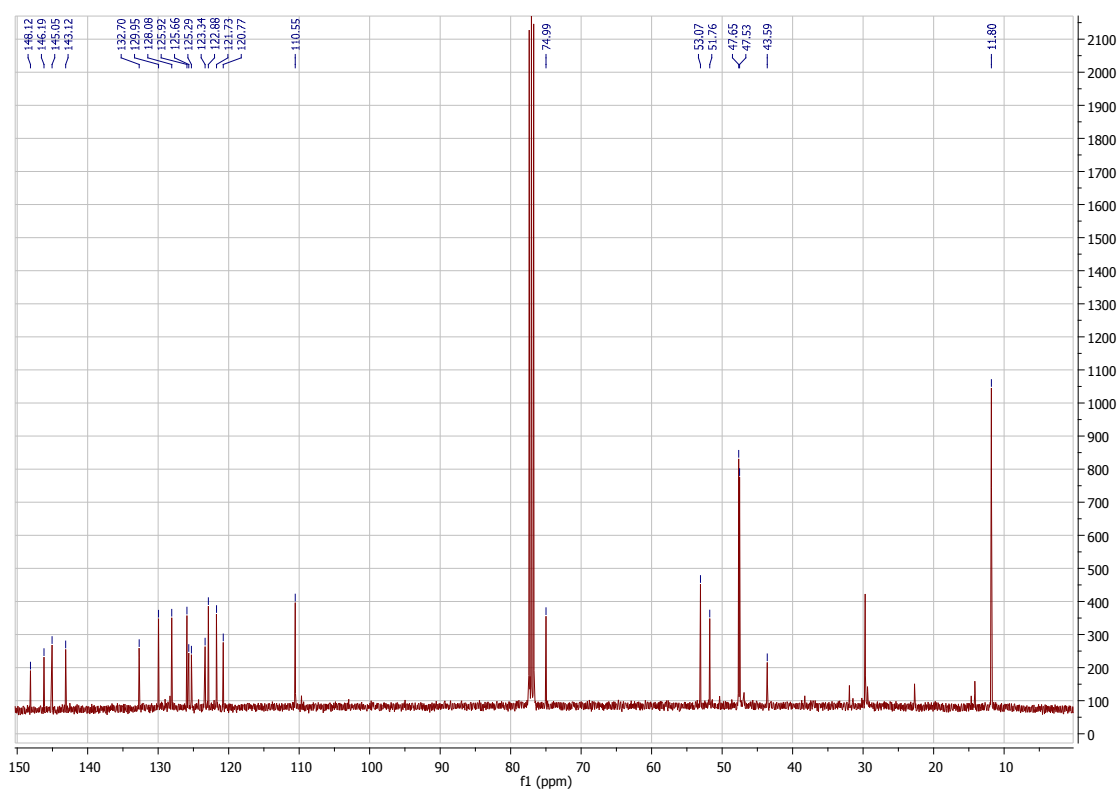


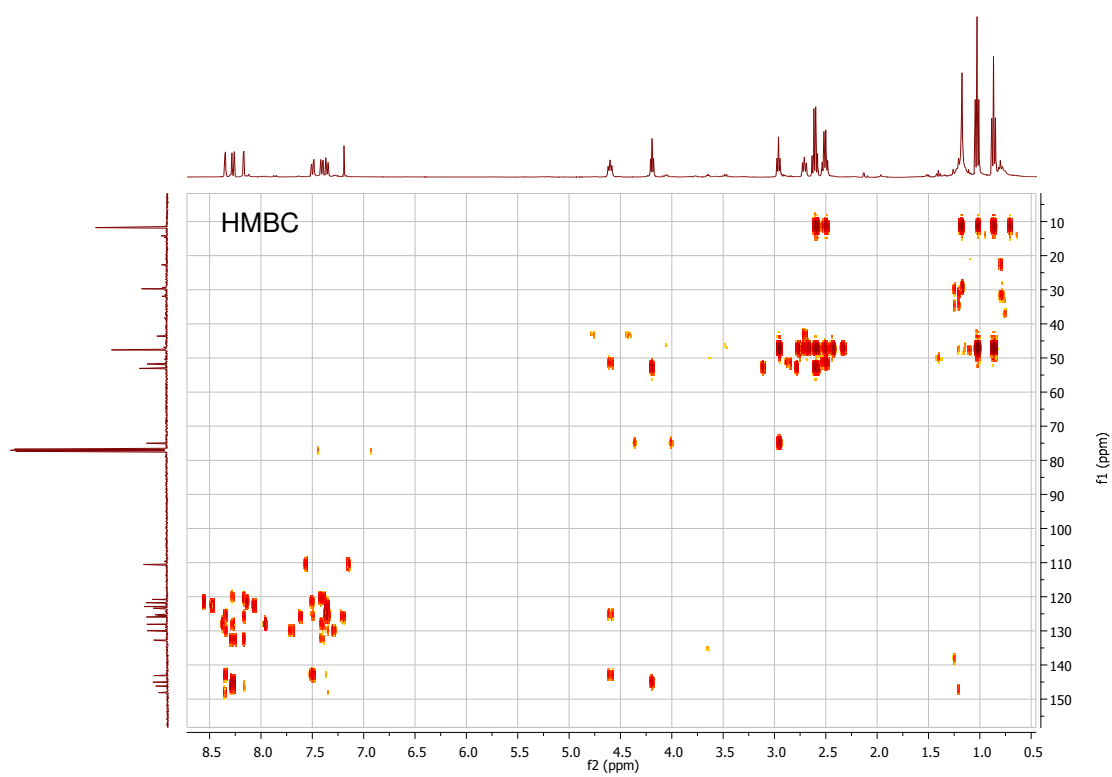
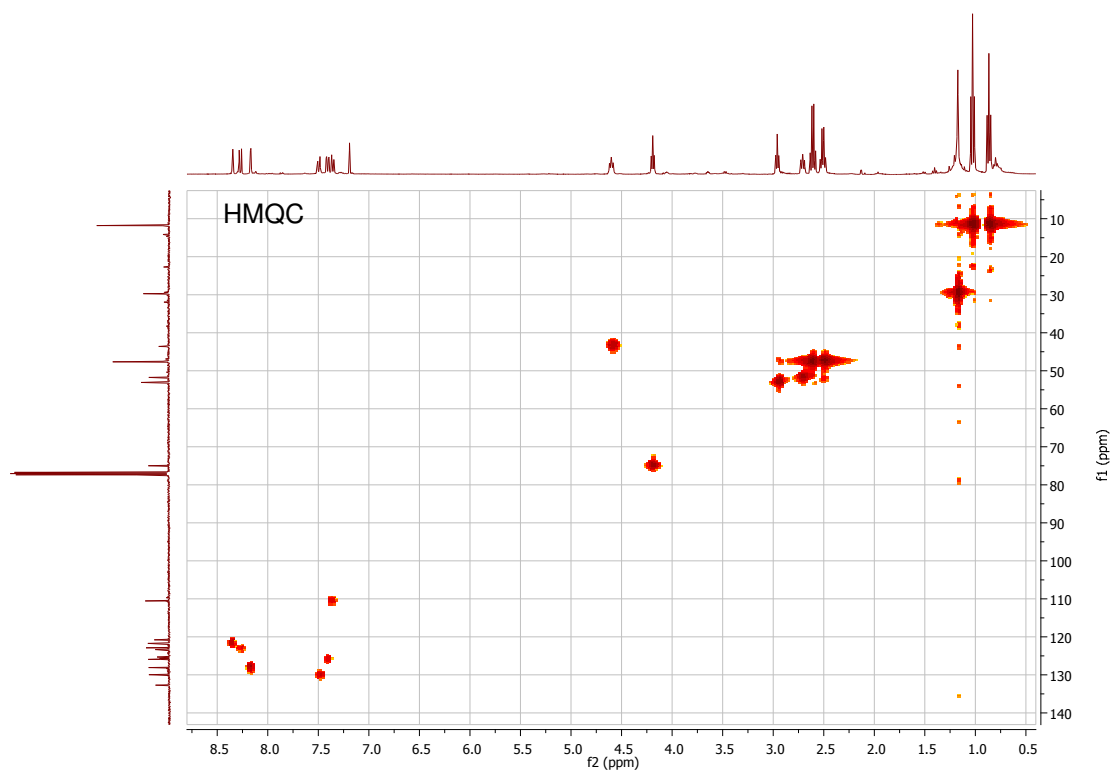


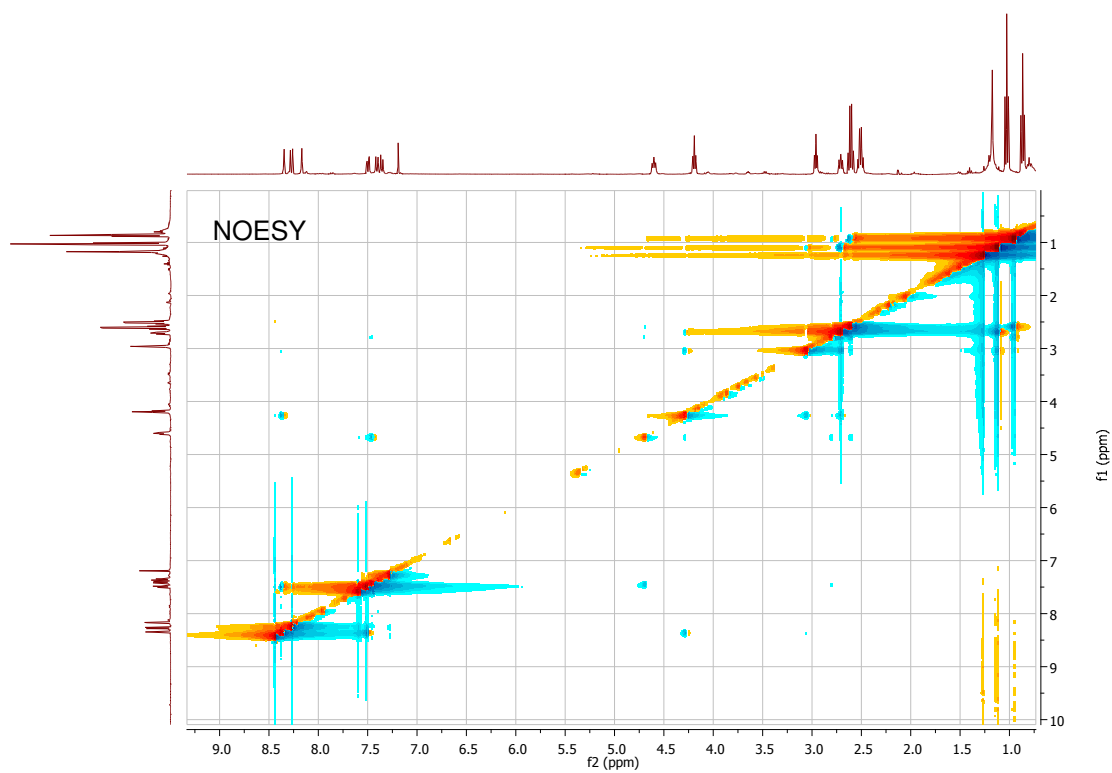


Anexo X. RMN de Protão e Carbono, COSY, HMQC, HMBC e NOESY da 2-{[3,7-dicloro-10-(2-(dietilamino)etil)-10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il]oxi}-*N,N*-dietiletanamina (77)

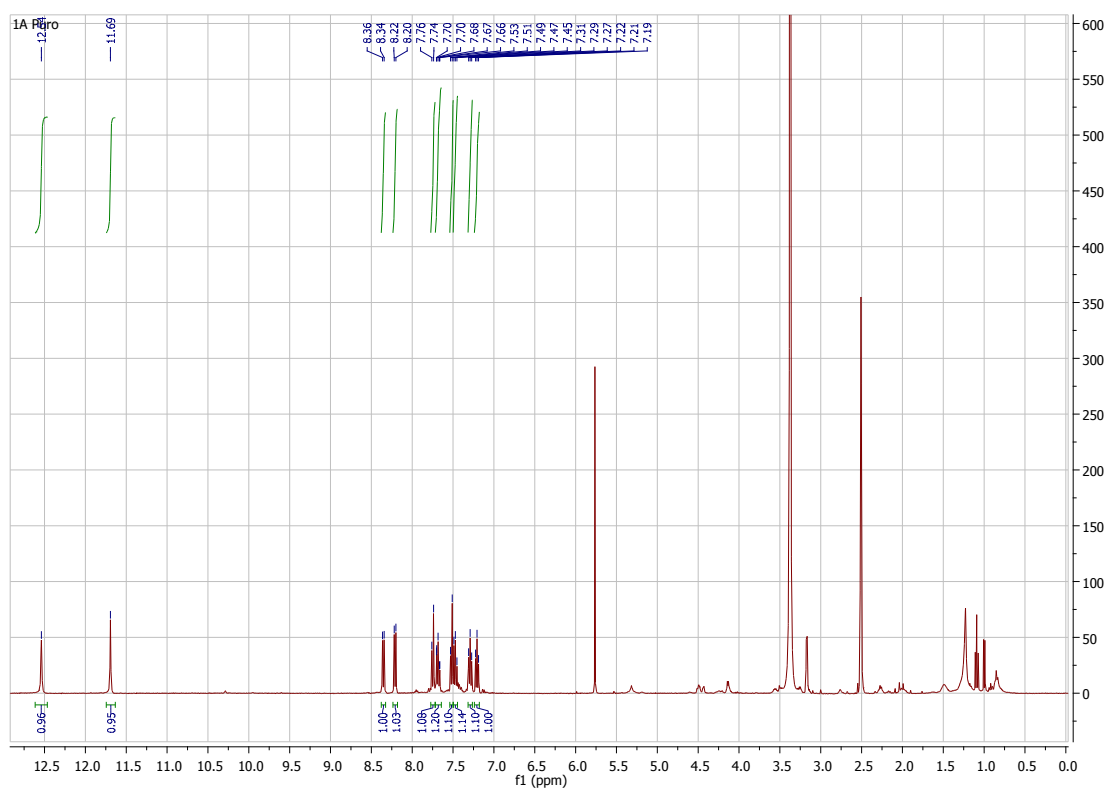
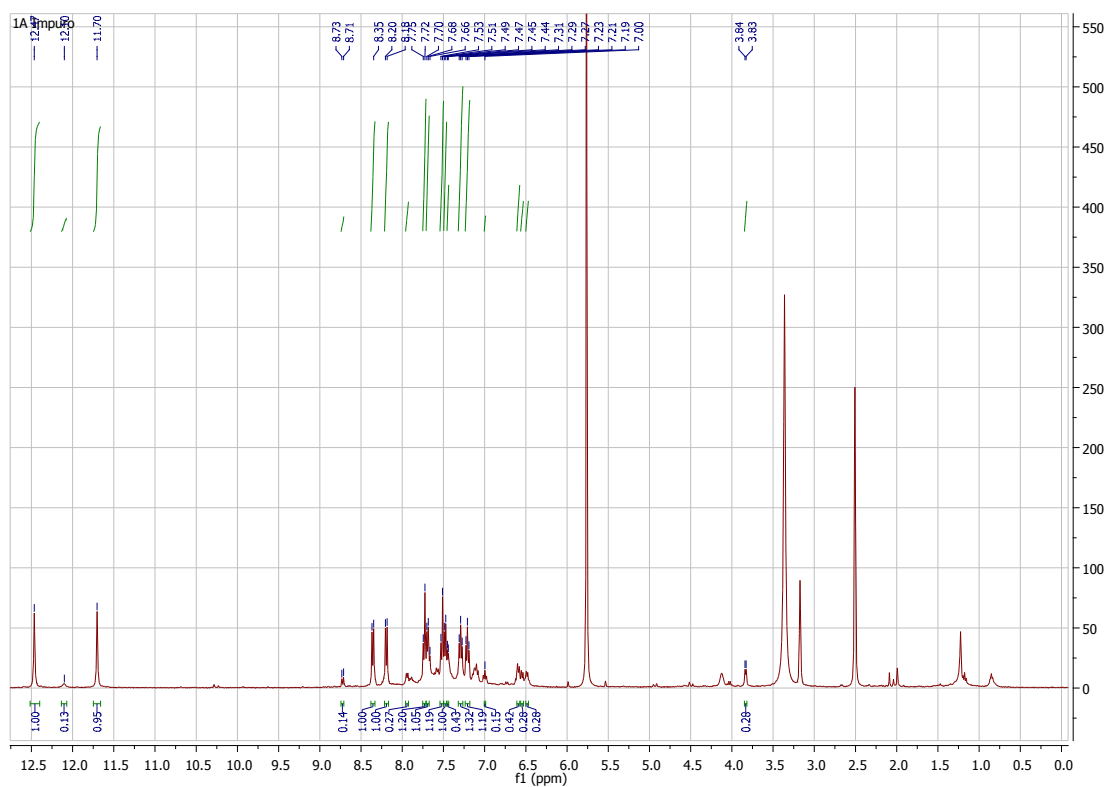




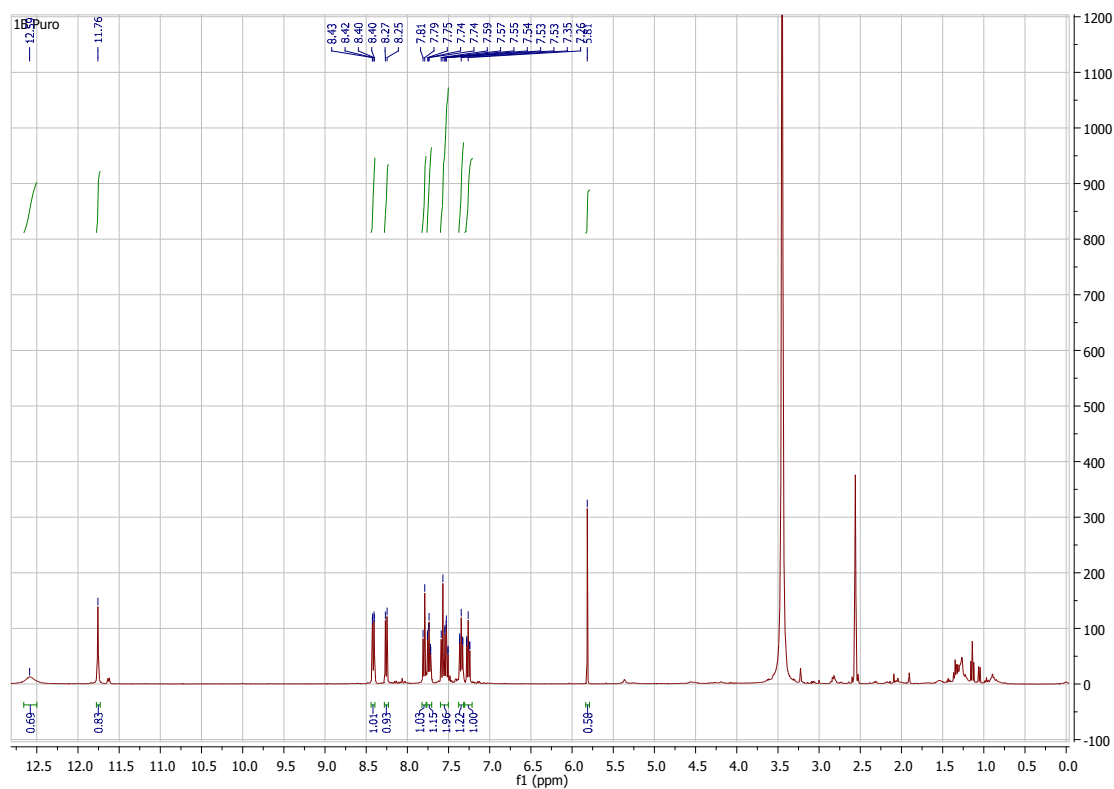
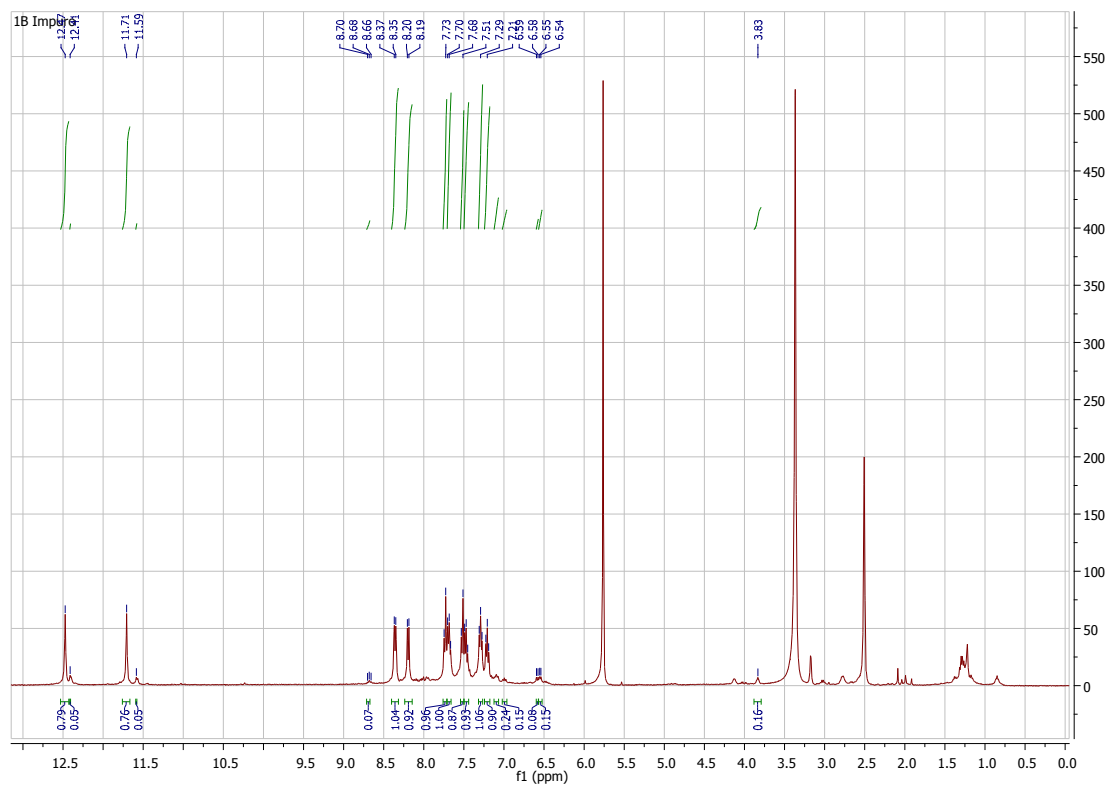




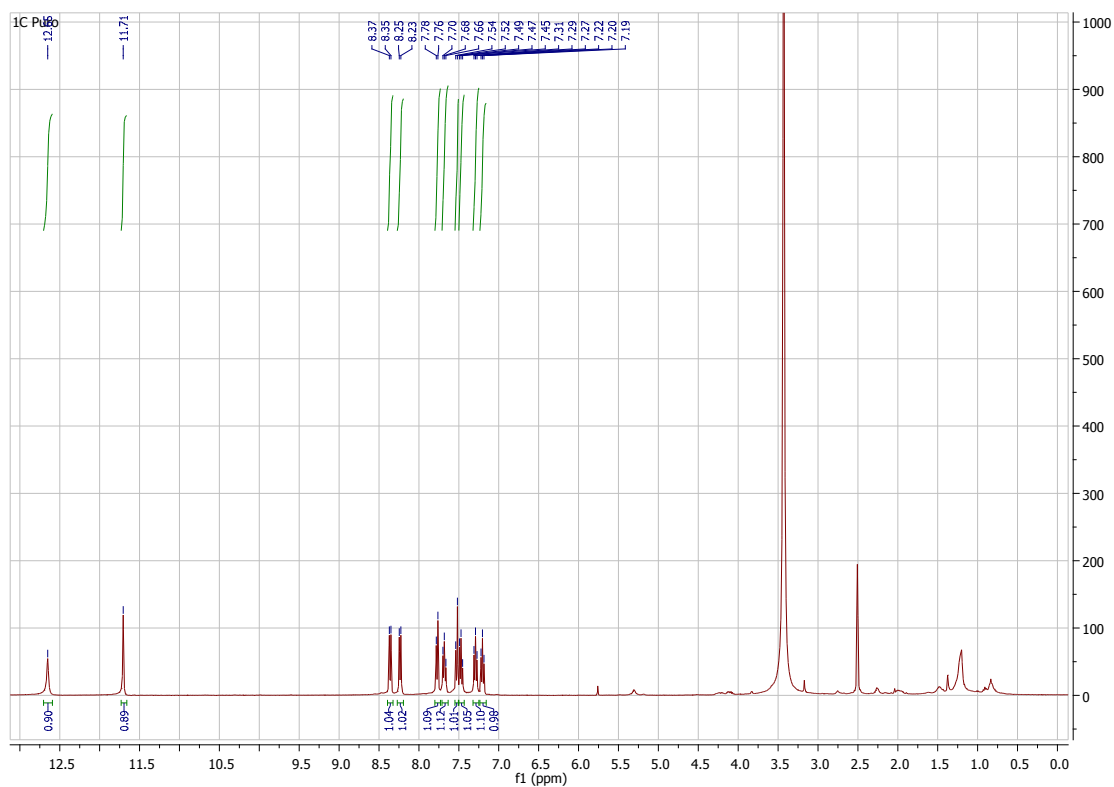
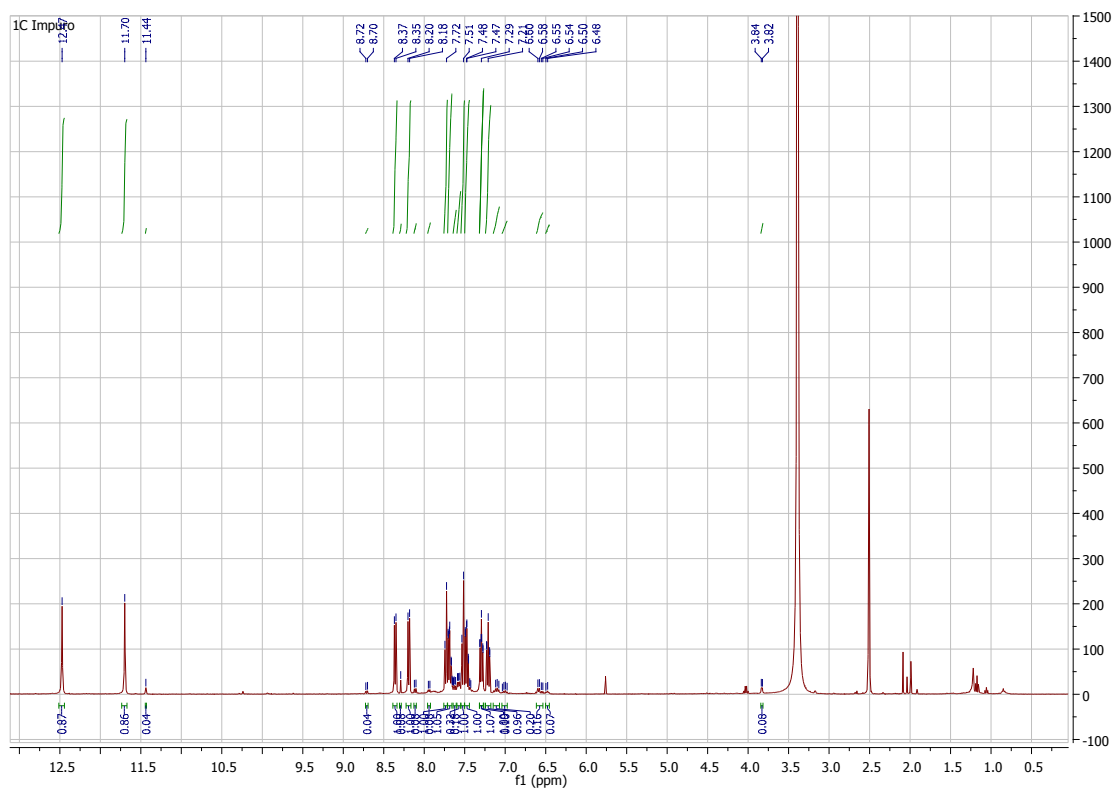
Anexo XI. RMN de Protão da Quindolona 1A (Impuro e Puro)



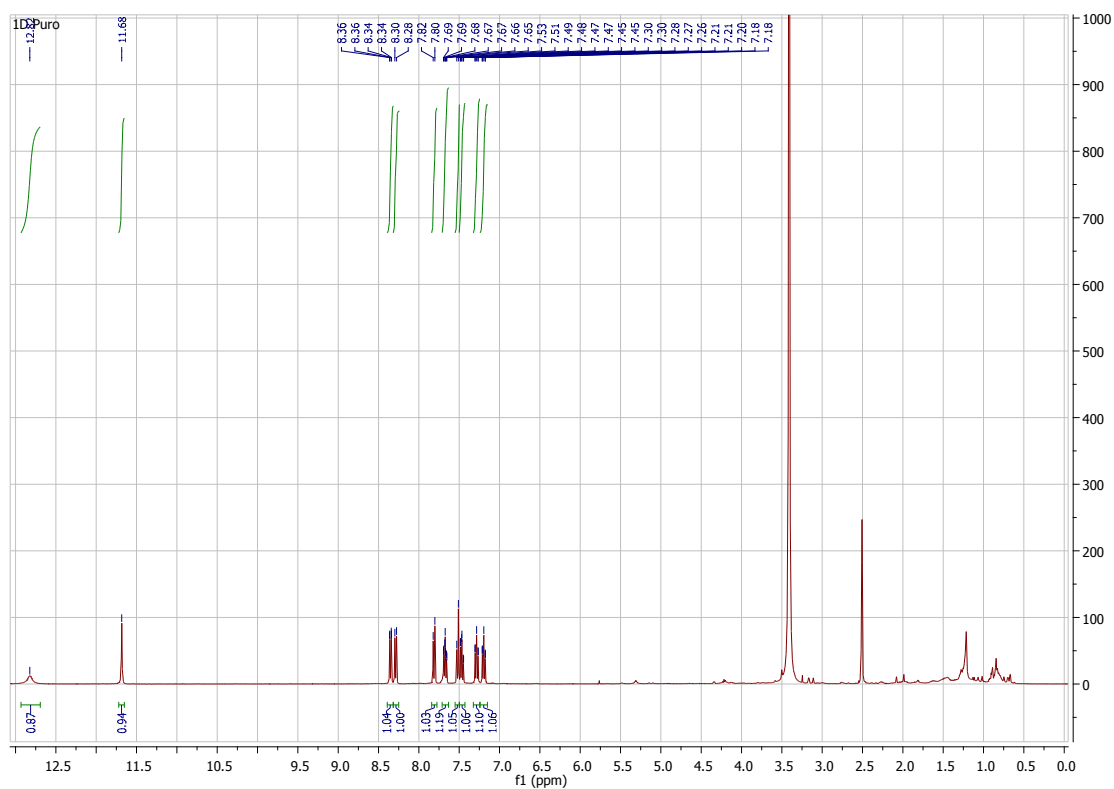
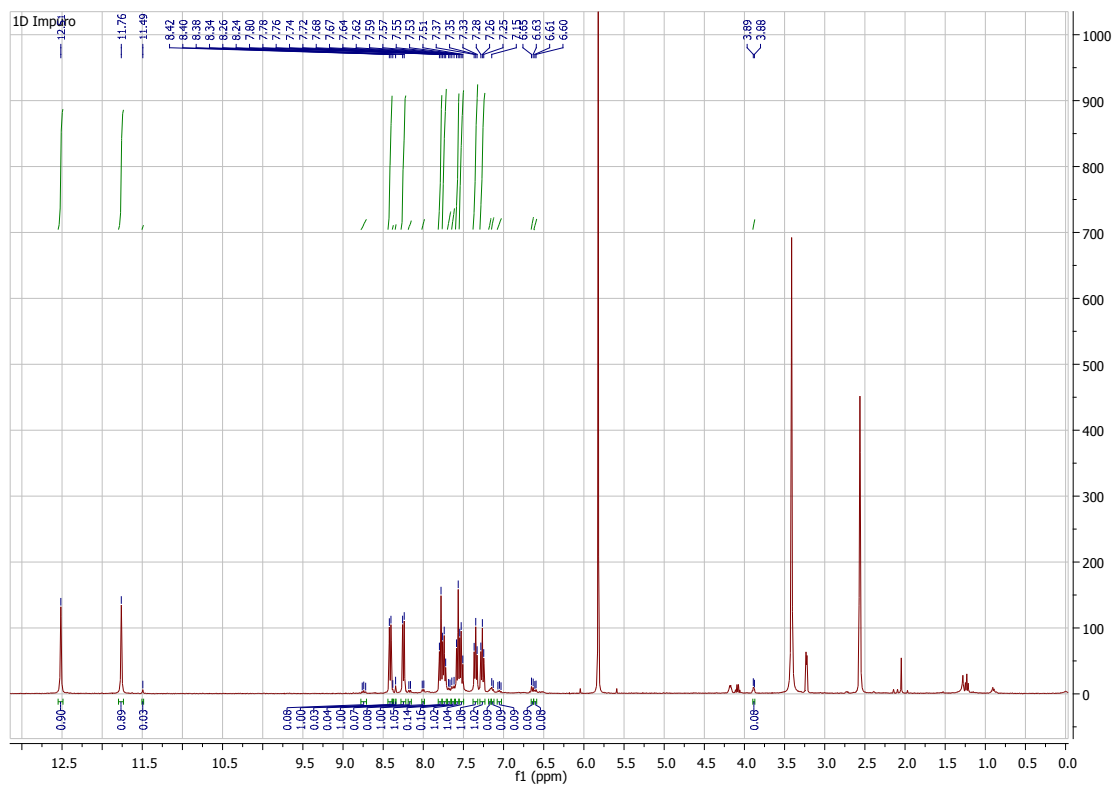
Anexo XII. RMN de Protão da Quindolona 1B (Impuro e Puro)



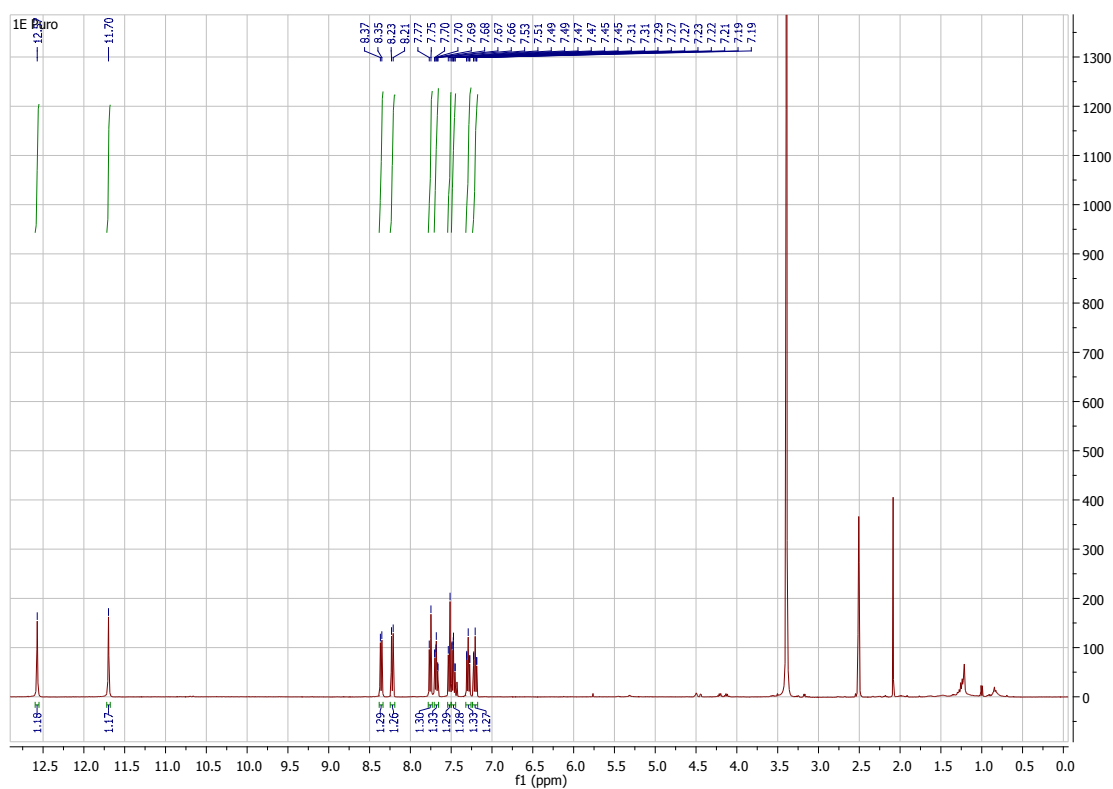
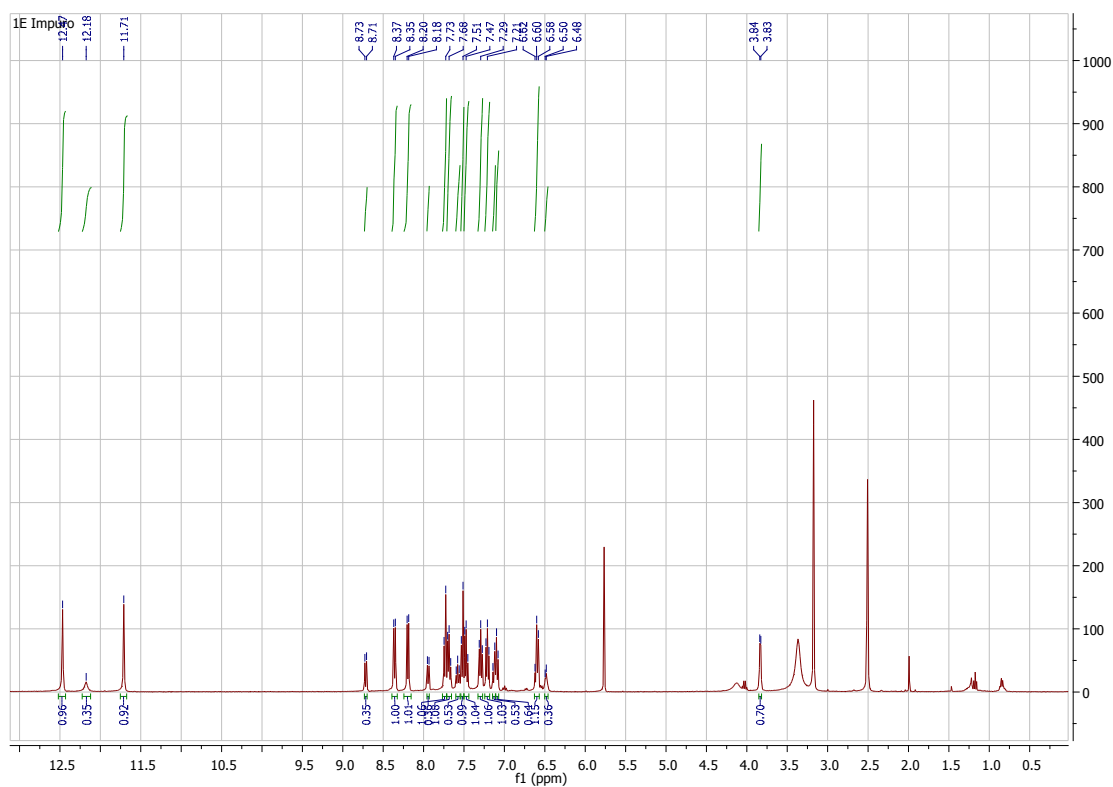
Anexo XIII. RMN de Protão da Quindolona 1C (Impuro e Puro)



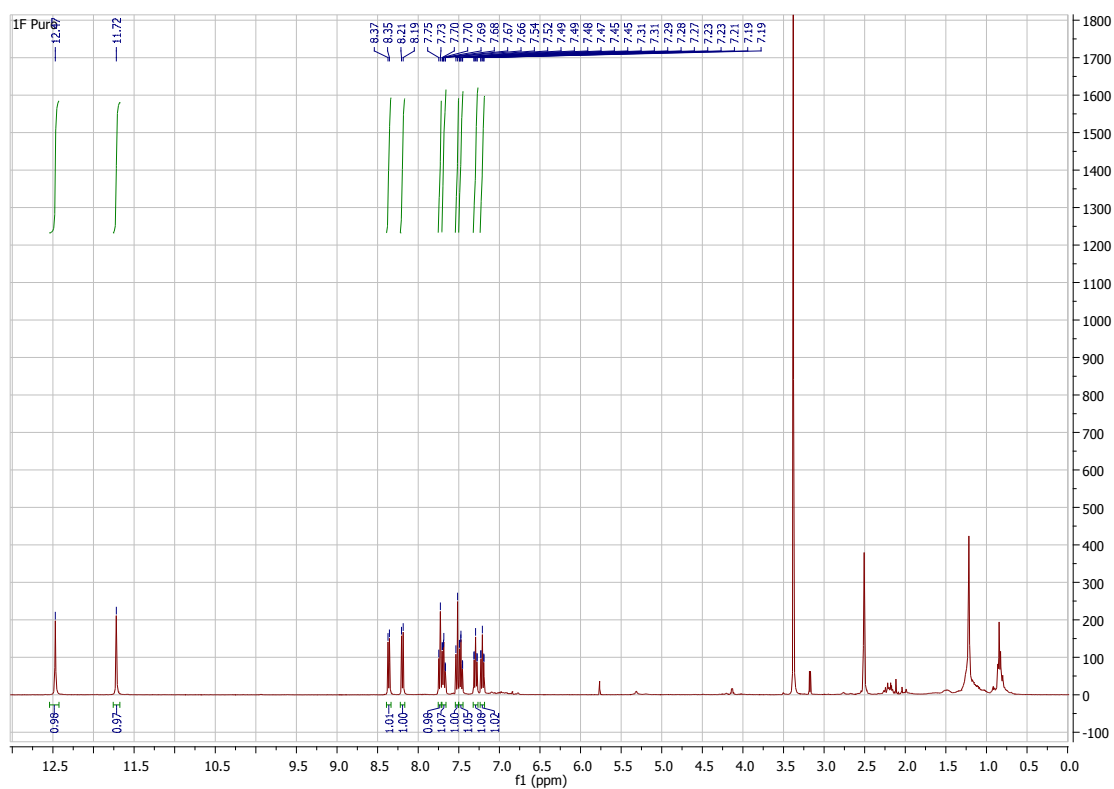
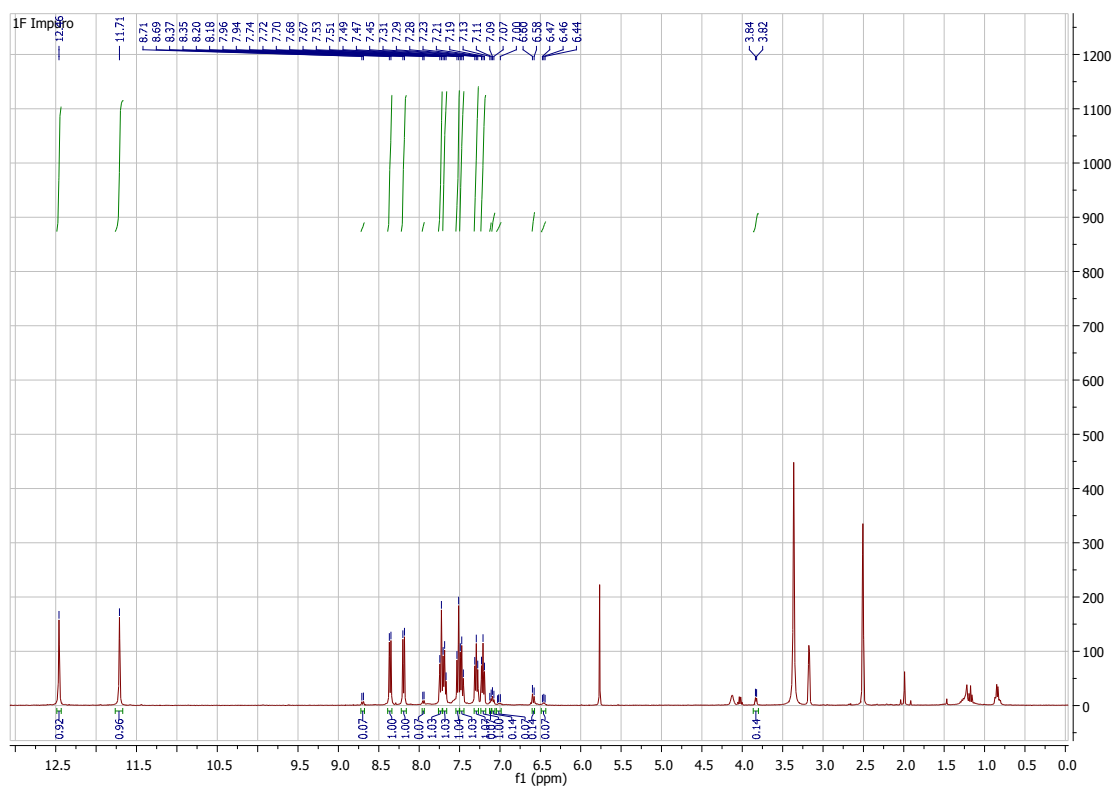
Anexo XIV. RMN de Protão da Quindolona 1D (Impuro e Puro)



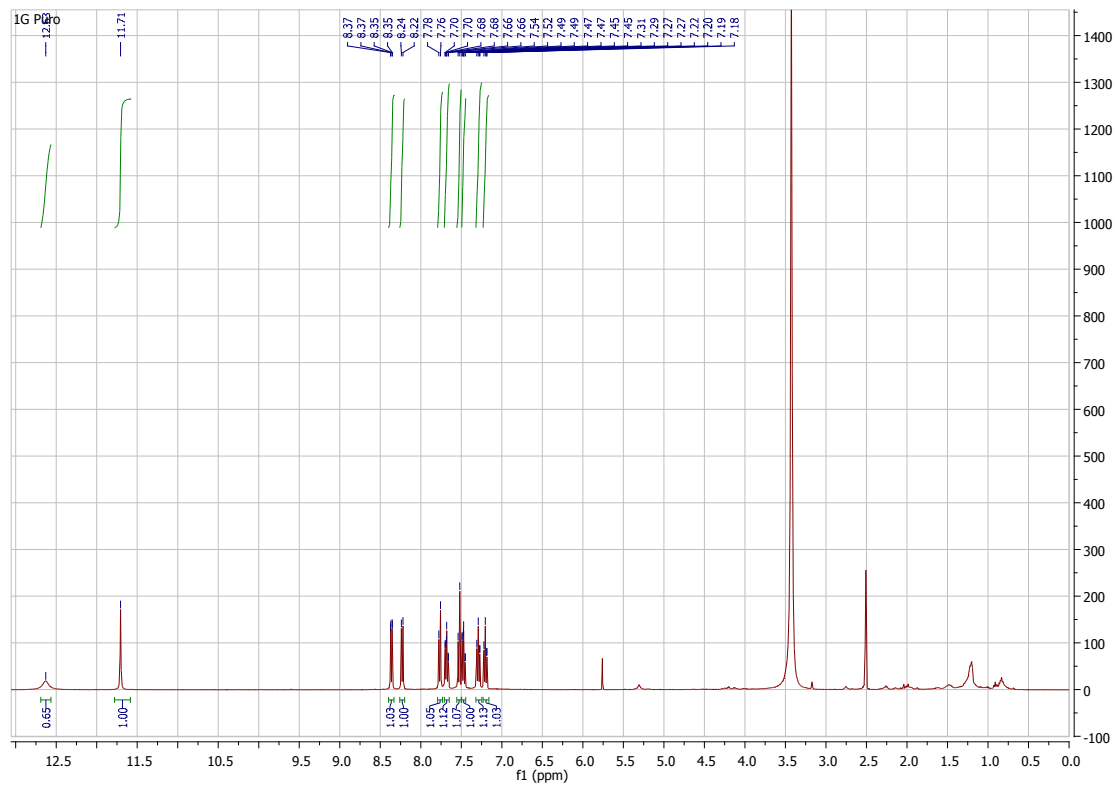
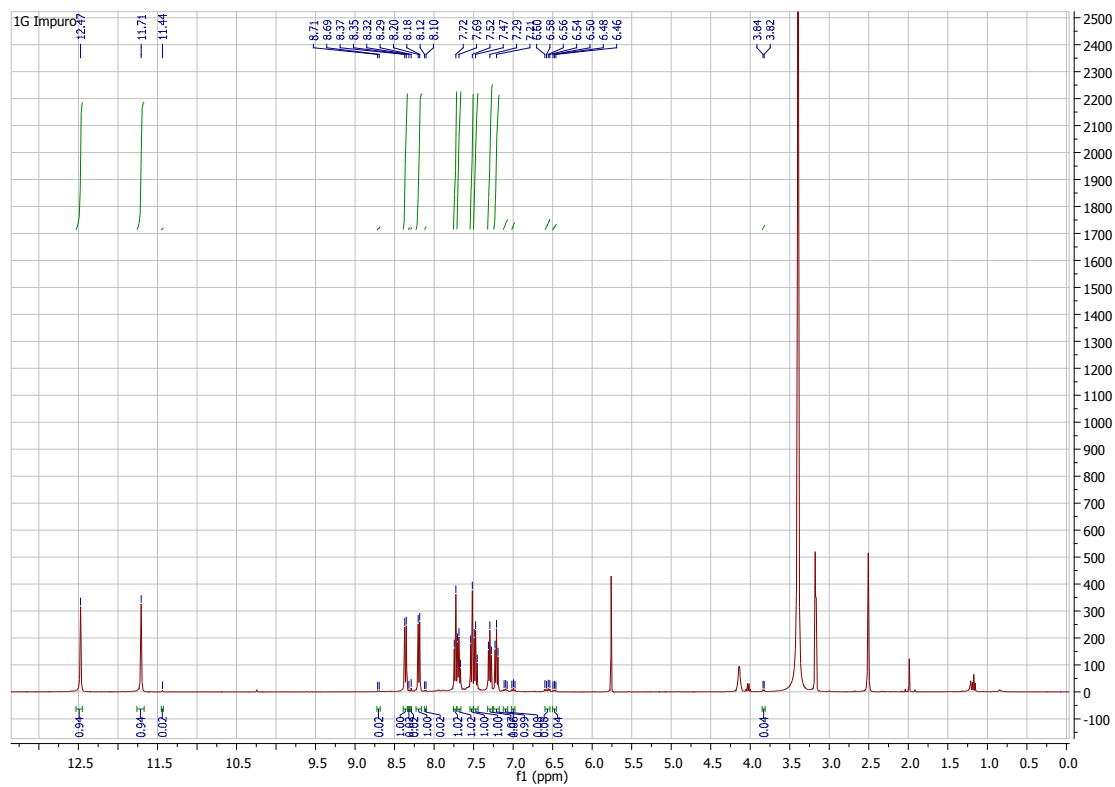
Anexo XV. RMN de Protão da Quindolona 1E (Impuro e Puro)



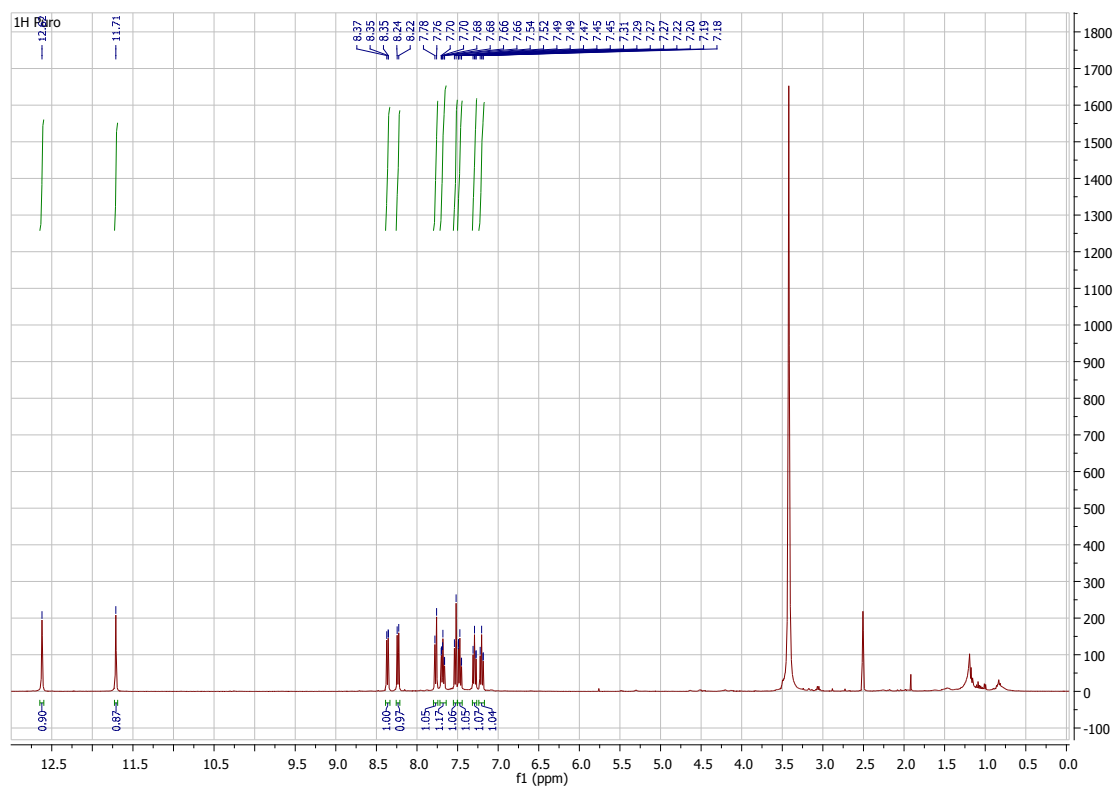
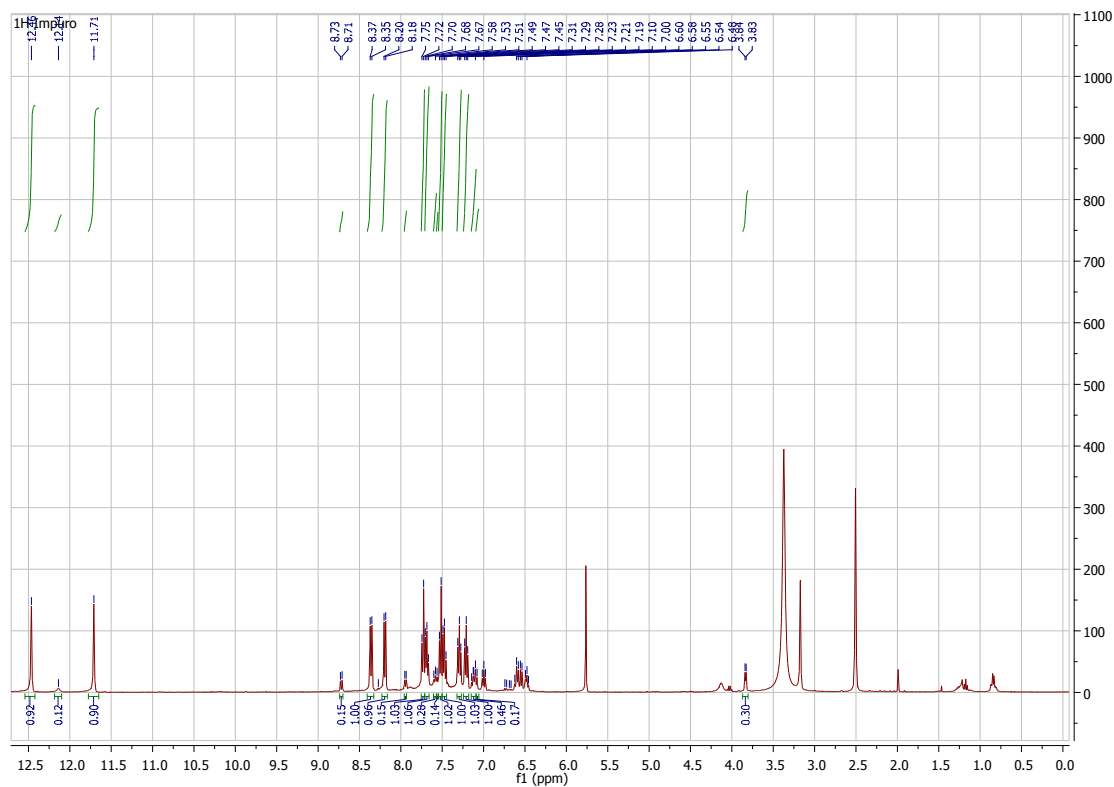
Anexo XVI. RMN de Protão da Quindolona 1F (Impuro e Puro)



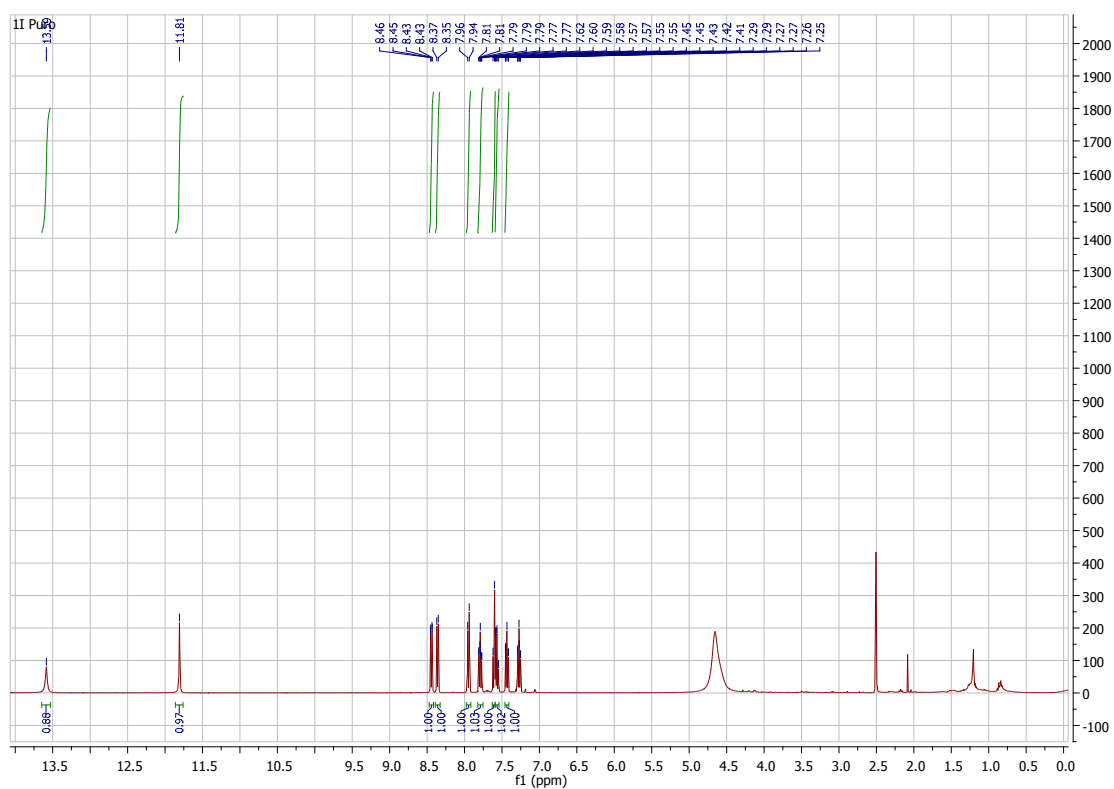
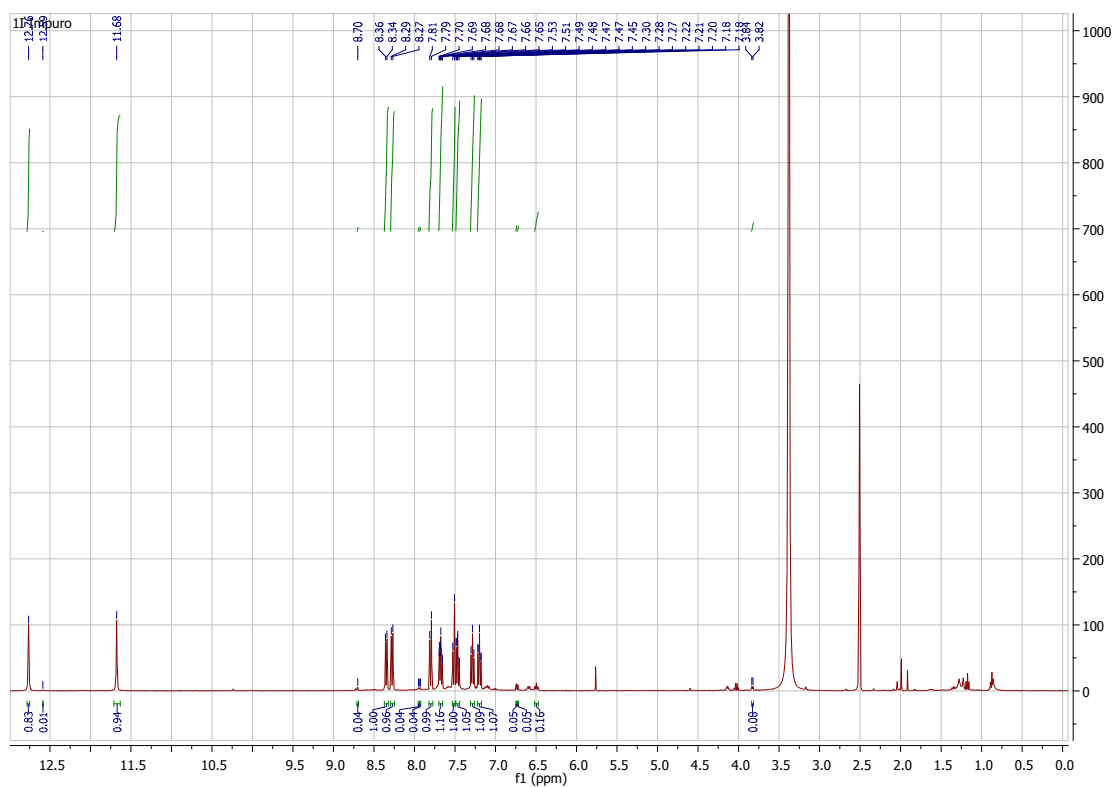
Anexo XVII. RMN de Protão da Quindolona 1G (Impuro e Puro)



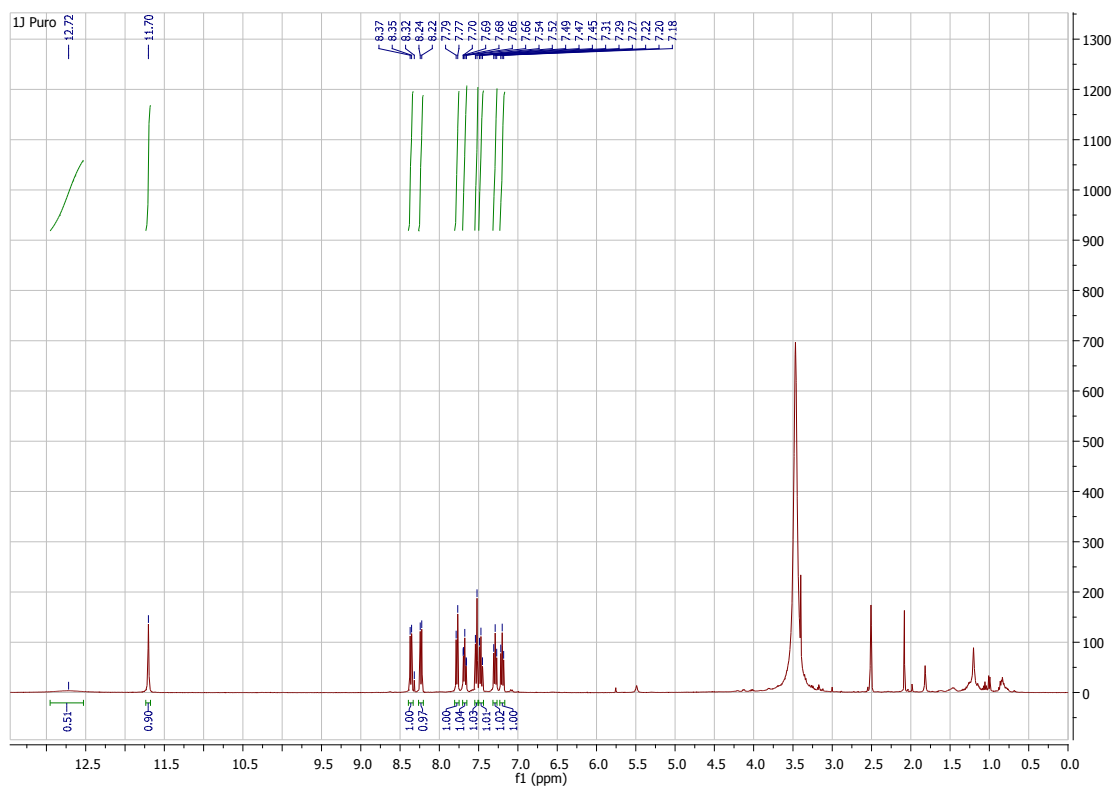
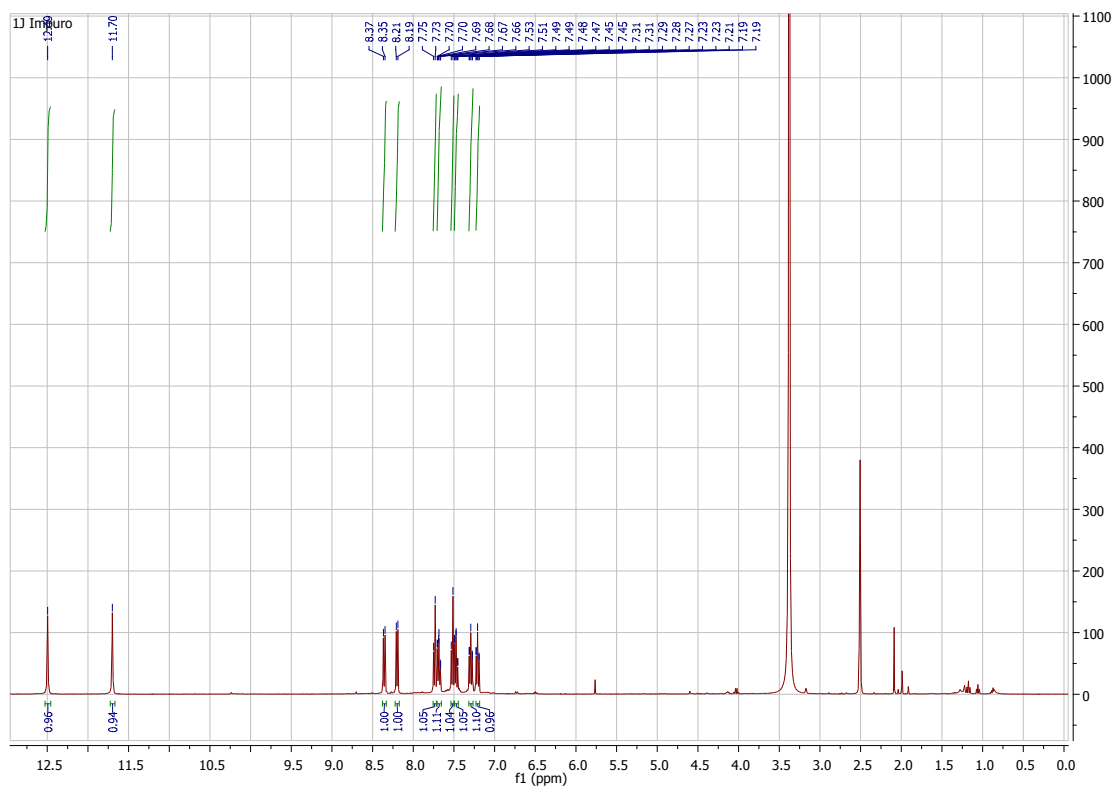
Anexo XVIII. RMN de Protão da Quindolona 1H (Impuro e Puro)



Anexo XIX. RMN de Protão da Quindolona 1I (Impuro e Puro)



Anexo XX. RMN de Protão da Quindolona 1J (Impuro e Puro)



Anexo XXI. Gráficos Concentração-Resposta da Cloroquina, Mefloquina e Derivados de Quindolonas para Clones de *Plasmodium falciparum* 3D7 e Dd2

